UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

LAURA PAVAN IÓCA

Estudo do metabolismo de fungos utilizando precursores isotopicamente marcados com ¹³C

São Carlos 2015 Laura Pavan lóca

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

Estudo do metabolismo de fungos utilizando precursores isotopicamente marcados com ¹³C

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

DEDICATÓRIA

Á minha família, José, Sueli e Mariana, pelo exemplo de vida, Ao Franco e Jack, pelo amor incondicional, Aos amigos, Yasmin, Victor e Raissa, sempre presentes.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck pela orientação, apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Antônio G. Ferreira (DQ - UFSCar) pela obtenção dos espectros de RMN.

Ao Prof. Dr. Álvaro J. Santos Neto e ao Dr. Guilherme M. Titato pelas análises de espectrometria de massas de alta resolução.

À Dra. Fabiana T. R. Martinelli e à Dra. Karin F. B. Camargo pelo apoio técnico.

À todos os colegas do Grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos pela amizade, sugestões e companhia nas longas semanas de HPLC.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida e à CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

"Somewhere, something incredible is waiting to be known." Carl Sagan

RESUMO

IÓCA, L. P. Estudo do metabolismo de fungos utilizando precursores isotopicamente marcados com ¹³C. 2015. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Este trabalho objetivou o estudo de rotas de formação de metabólitos secundários utilizando precursores isotopicamente marcados com ¹³C. Os experimentos de crescimento com adição de [1-¹³C]acetato, [1,2-¹³C₂]acetato e [U-¹³C₃¹⁵N₁]-L-cisteína para o fungo do ambiente marinho *Penicillium* sp. DRF2 mostrou que as ciclotiocurvularinas são provenientes da rota de formação de policetídeos e pela incorporação de L-cisteína, depois da transformação desta em 3-mercaptopiruvato. Os resultados sugerem que a formação das ciclotiocurvularinas provém de um processo de detoxificação da α , β -desidrocurvularina. O estudo do metabolismo secundário de *Aspergillus* sp. DLM3-8, também do ambiente marinho, mostrou que o seu perfil metabólico produzido em experimentos de crescimento sob diferentes condições é constante. Os experimentos de incorporação de precursores isotopicamente marcados com ¹³C na naftoquinonaimina, produzida por *Aspergillus* sp. DLM3-8 foram inconclusivos, indicando que outras abordagens experimentais devem ser realizadas para se investigar a biossíntese deste metabólito.

Palavras chaves: fungo marinho, produtos naturais, biossíntese, detoxicação, precursores marcados.

ABSTRACT

IÓCA, L. P. **Study of the metabolism of fungi using isotopically** ¹³**C-labeled precursors**. 2015. Dissertation (M.Sc.) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

This investigation aimed investigated the formation routes of secondary metabolites using ¹³C-labelled precursors. Feeding experiments with [1-¹³C]acetate, [1,2- $^{13}C_2$ acetate and $[U^{-13}C_3^{-15}N_1]$ -L-cysteine within the growth medium of the marinederived fungi *Penicillium* sp. DRF2 showed that cyclothiocurvularins are derived from polyketides and from the incorporation of a L-cysteine residue, after its transformation into 3-mercaptopyruvate. The results formation suggest that the of cyclothiocurvularins is derived from a detoxification process of α , β -dehydrocurvularin. Investigation of the secondary metabolism of a marine-derived Aspergillus sp. DLM3-8 indicated a stable metabolic profile under a variety of growth conditions. Feeding experiments with ¹³C-labelled precursors for the biosynthesis investigation of naphthoquinoneimine were inconclusive, indicating that other methodologies should be envisaged in order to investigate the biosynthesis of this metabolite.

Keywords: marine-derived fungi, natural products, biosynthesis, detoxification, ¹³Clabeled precursors.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1.1 - Processos bioquímicos envolvidos na formação de precursores biossintéticos.	15
Figura 1.2 - Efeito da incorporação de precursores marcados com ¹³ C no espectro de RMN de ¹³ C.	o 16
Figura 1.3 - Mecanismo de formação de ácidos graxos e policetídeos	20
Figura 1.4 - Mecanismo envolvidos na formação de ácidos graxos e policetídeos, discriminando as reações de cada domínio enzimático	21
Figura 1.5 - Mecanismo de reação hipotético para o domínio KS de PKS	22
Figura 1.6 - Mecanismo de reação hipotético para o domínio KR de PKS	23
Figura 1.7 - Mecanismo de reação hipotético para o domínio DH de PKS	23
Figura 1.8 - Mecanismo de reação hipotético para o domínio ER de PKS	24

Capítulo 3

Capítulo 4

Figura 4.1 - Proposta biossintética para a α , β -desidrocurvularina
Figura 4.2 - Transformação de α , β -desidrocurvularina em 11-hidroxi-curvularina3
Figura 4.3 - Formação de α , β -desidrocurvularina por iPKS
Figura 4.4 - Curva de produção da ciclotiocurvularina A produzido em meio de cultura pela linhagem fúngica <i>Penicillium</i> sp. DRF24
Figura 4.5 - Morfologia macroscópica da linhagem fúngica <i>Penicillium</i> sp. DRF2 na ausência de precursor (a) e na presença de 0,5 g/L de L-Cys (b)4
Figura 4.6 - Sobreposição dos cromatogramas (λ _n = 254 nm) do extrato do meio de cultura da linhagem fúngica <i>Penicillium</i> sp. DRF2 com adição de L-Cys nas concentrações 0,0 g/L (preto), 0,5 g/L (azul) e 2,0 g/L (ciano)4
Figura 4.7 - Espectros de massas de alta resolução do composto ciclotiocurvularina A (A, padrão) isolado do experimento com adição dos precursores: B) [1- ¹³ C]AcONa, C) [1,2- ¹³ C ₂]AcONa e D) [U- ¹³ C ₃ ¹⁵ N]-L-Cys4
Figura 4.8 - Espectros de RMN de ¹³ C (MeOH- <i>d</i> ₄ , 100 MHz, 12 h) da ciclotiocurvularina A sem marcação isotópica (preto) e isolada do experimento

	com adição do precursor [1- ¹³ C]AcONa (vermelho). Espectros processados e sobrepostos no programa MestReNova.	45
Figu	ura 4.9 - Espectros de RMN de ¹³ C (MeOH- <i>d</i> ₄ , 100 MHz, 12 h) da ciclotiocurvularina A sem marcação isotópica (preto) e isolada do experimento com adição do precursor [1,2- ¹³ C ₂]AcONa (vermelho). Espectros processados sobrepostos no programa MestReNova.	e 45
Figu	ura 4.10 - Espectros de RMN de ¹³ C (MeOH- <i>d</i> ₄ , 100 MHz, 12 h) da ciclotiocurvularina A sem marcação isotópica (preto) e isolada do experimento com adição do precursor [U- ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₁]-L-Cys (azul). Espectros processados e sobrepostos no programa MestReNova.	46
Figu	ura 4.11 - Sobreposição dos cromatogramas da fração F2 oriunda da EFS do meio de cultivo da linhagem fúngica <i>Penicillium</i> sp. DRF2 após enriquecimento com precursores isotopicamente marcados.) 47
Figu	ura 4.12 - Espectro de massas de outros compostos produzidos por <i>Penicillium</i> sp. DRF2 nos experimentos com adição de precursores isotopicamente marcados.	48
Figu	ura 4.13 - Propostas de rotas biossintéticas para a ciclotiocurvularina A	49
Figu	ura 4.14 - Mecanismo hipotético para a formação de ciclotiocurvularina A e sumalarina C via glutationa transferase	51
Figu	ura 4.15 – Espectro de massas dos compostos produzidos por <i>Penicillium</i> sp. DRF2 no experimento de cultivo com adição de homocisteína5	512

Capítulo 5

Figura 5.1 - Proposta de rota biossintética para as piranonigrinas S e A	56
Figura 5.2 - Proposta de rota biossintética para a piranonigrina E	57
Figura 5.3 - Hipóteses de rotas de biossíntese para a piranonigrina B	59
Figura 5.4 - Hipótese para a rota de biossíntese da naftoquinonaimina	60
Figura 5.5 - Curva de produção da piranonigrina C produzida pela linhagem Aspergillus sp. DLM3-8	73
Figura 5.6 - Curva de produção da naftoquinonaimina produzida pela linhagem Aspergillus sp. DLM3-8	73

LISTA DE TABELAS

Capítulo 4

Fabela 4.1 - Medidas da área sob o pico correspondente a ciclotiocurvularina A
produzida pela linhagem fúngica <i>Penicillium</i> sp. DRF2. em cultivos com tempos
diferentes de crescimento
Fabela 4.2 - Taxa de incorporação (em %) de precursores isotopicamente marcados
com ¹³ C na ciclotiocurvularina A44

Capítulo 5

Tabela 5.1 - Níveis das variáveis para os experimentos realizados para o PFF para o fungo <i>Aspergillus</i> sp. DLM3-8) 3
Tabela 5.2 - Valores utilizados para cda variável nos experimentos do PFF para o fungo Aspergillus sp. DLM3-86	3
Tabela 5.3 - Análise das metodologias de extração dos metabólitos produzidos em meio de cultura da linhagem fúngica <i>Aspergillus</i> sp. DLM3-8	8
Tabela 5.4 - Medida da área sob a curva do pico correspondente à naftoquinonaimina (R1, R2 e R3 representam a triplicata)6	9
Tabela 5.5 - Cálculo da função desejabilidade e efeitos de 1ª e 2ª ordem no PFF para a naftoquinonaimina7	0
Tabela 5.6 - Condições de crescimento estabelecidas para aprimorar a produção denaftoquinonaimina por Aspergillus sp. DLM3-8.7	1
Tabela 5.7 - Medida da área sob a curva do pico correspondente à piranonigrina C e naftoquinonaimina7	։ 2

SUMÁRIO

RESUMO		vi
ABSTRACT		vii
LISTA DE F	IGURAS	viii
LISTA DE T	ABELAS	x
Capítulo 1	Introdução	14
1.1 Estud isotopicar	o de rotas biossintéticas de produtos naturais utilizando precursores nente marcados	14
1.2 Estud	o de biossíntese de produtos naturais de micro-organismos no Brasil	17
1.3 Biossí	íntese de Policetídeos	19
Capítulo 2	Objetivos	25
Capítulo 3	Procedimentos experimentais	26
3.1 Equip	amentos e Reagentes	26
3.1.1 E	spectrometria de Massas (EM)	26
3.1.2 C	romatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	26
3.1.3 R	essonância Magnética Nuclear (RMN)	26
3.1.4 Se	olventes	27
3.1.5 Pi	recursores biossintéticos	27
3.2 Gener	alidades	27
3.2.1 Pi	rocedimento geral utilizado no projeto	27
3.2.2 M	eios de cultura	28
3.2.3 S	uspensão de esporos	28
Capítulo 4 cultura pela	Estudo da rota de formação da ciclotiocurvularina A produzida em r linhagem fúngica <i>Penicillium</i> sp. DRF2	neio de 30
4.1 Biossí	íntese de lactonas do ácido dihidroxifenilacético	30
4.2 Produ	tos naturais de fungos contendo um resíduo mercaptolactato	33
4.3 Metod	lologia	35

4.3.4 Experimento de incorporação de precursores isotopicamente marcados
4.3.5 Isolamento e purificação da ciclotiocurvularina A enriquecida
4.3.6 Análise por ressonância magnética nuclear do composto ciclotiocurvularina A isotopicamente marcada
4.3.7 Experimento de incorporação de homocisteína
4.3.8 Isolamento e purificação das frações oriundas do meio de crescimento
enriquecido com homocisteína do fungo <i>Penicillium</i> sp. DRF2
4.4 Resultados e Discussão
4.4.1 Obtenção da curva de produção da ciclotiocurvularina A por <i>Penicillium</i> sp. DRF2
4.4.2 Testes de toxicidade com precursores não marcados isotopicamente40
4.4.3 Experimentos de biossíntese para ciclotiocurvularina A42
4.4.4 Experimento de cultivo enriquecido com homocisteína
Capítulo 5 Estudo do metabolismo secundário da linhagem fúngica Aspergillus sp. DLM3-
8 para a produção de metabólitos de interesse54
5.1 O gênero Aspergillus spp54
5.2 Compostos pirano-pirróis: a classe das piranonigrinas55
5.3 Alcalóides α -pironas
5.4 Metodologia61
5.4.1 Produção de piranonigrina C e naftoquinonaimina por Aspergillus sp. DLM3-861
5.4.2 Estudo da melhor metodologia de extração dos metabólitos produzidos em meio de cultivo62
5.4.3 Planejamento fatorial fracionário (PFF)62
5.4.4 Testes para o cultivo da linhagem <i>Aspergillus</i> sp. DLM3-864
5.4.5 Curva de produção de metabólitos secundários64
5.4.6 Teste de toxicidade com precursores não-marcados isotopicamente
5.4.7 Testes de incorporação de precursores isotopicamente marcados
5.5 Resultados e Discussão67
5.5.1 Produção dos compostos piranonigrina C e naftoquinonaimina67
5.5.2 Estudo da melhor metodologia de extração dos metabólitos produzidos em meio de cultivo
5.5.3 Planejamento fatorial fracionário68
5.5.4 Testes para o cultivo da linhagem Aspergillus sp. DLM3-871
5.5.5 Curva de produção de metabólitos secundários72
5.5.6 Teste de toxicidade com precursores não-marcados isotopicamente

5.5.7 Te	estes de incorporação de precursores isotopicamente marcados	74
Capítulo 6	Conclusões	76
Capítulo 7	Referências Bibliográficas	77
ANEXOS		82

Capítulo 1 Introdução

1.1 Estudo de rotas biossintéticas de produtos naturais utilizando precursores isotopicamente marcados

Metabólitos secundários (produtos naturais, PNs) são compostos produzidos por um organismo ou grupo de organismos que para a maioria dos quais ainda não se conhece a função. A diversidade e complexidade estrutural dos PNs inspiram químicos há algumas décadas, principalmente por suas atividades biológicas, que os tornam moléculas versáteis para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (DEWICK, 2009).

Os PNs podem ser divididos nas seguintes classes estruturais: policetídeos, peptídeos não-ribossomais, terpenos, alcalóides ou de biossíntese mista (figura 1.1). O conjunto de genes que expressa a biossíntese de um determinado metabólito contém informações sobre a maquinaria enzimática utilizada pelo organismo para a sua produção (CLARDY e WALSH, 2004).

Em conjunto com abordagens de biologia molecular, o desenvolvimento de novas metodologias de isolamento e caracterização de biomoléculas, possibilitou a investigação mais detalhada das rotas biossintéticas e uma maior compreensão dos mecanismos de ação das enzimas envolvidas.

A abordagem clássica utilizada para estudos de biossíntese de PNs consiste em correlacionar precursores isotopicamente marcados com a estrutura do composto, empregando técnicas de espectrometria de massas (EM) e de ressonância magnética nuclear (RMN). Até o início da década de 80, utilizou-se substratos enriquecidos com átomos radioativos, por exemplo ¹⁴C, monitorando a emissão de radiação em pontos específicos do composto enriquecido e em fragmentos gerados após sua degradação.

O uso de isótopos estáveis e magneticamente ativos, como por exemplo ²H, ¹³C, ¹⁸O e ¹⁵N, deu-se com os avanços das análises por EM e RMN e a possibilidade de diferenciá-los de compostos isotopicamente não marcados. Enquanto que a EM não designa especificamente em qual átomo o isótopo foi incorporado, a análise do padrão de fragmentação (EM-EM) de um dado composto por ou por RMN permite tal atribuição sem ambiguidade (SCHNEIDER, 2007; MACEDO JÚNIOR, 2007).



Figura 1.1 - Processos bioquímicos envolvidos na formação de precursores biossintéticos.

O isótopo de ¹³C é o mais utilizado para a elucidação de rotas de biossíntese. Sua distribuição isotópica na natureza é de 1,1 %, enquanto o restante (98,9 %) é proveniente do isótopo magneticamente inerte (¹²C). Assim, o uso de precursores

Fonte: Adaptado de DEWICK (2009).

enriquecidos com ¹³C confere à RMN deste núcleo uma excelente ferramenta de estudo.

Considerando-se um precursor hipotético de dois carbonos, o uso deste isotopicamente marcado com ¹³C em um estudo de biossíntese pode se desenvolver de diferentes maneiras, como ilustrado na figura 1.2. Se a marcação é simples, ou seja, em um de seus carbonos (C₁ ou C₂), o mapeamento da incorporação é determinado pela comparação da intensidade dos sinais nos espectros de RMN de ¹³C do metabólito padrão (com abundância natural de carbono ¹³C, figura 1.2a) e do metabólito marcado (figura 1.2b e c). A diferença entre as intensidades (Δ I) fornece a taxa de incorporação do precursor.

Figura 1.2 - Efeito da incorporação de precursores marcados com ¹³C no espectro de RMN de ¹³C.



Fonte: Adaptado de MACEDO JÚNIOR (2007).

Se a marcação é em ambos os carbonos (C₁ e C₂), os sinais satélites resultantes do acoplamento ¹³C-¹³C (¹J_{CC}) ficam evidentes no espectro de RMN de ¹³C, caso a ligação permaneça intacta ao longo da rota biossintética (figura 1.2d).

Caso a ligação seja rompida, os carbonos originados fornecerão singletos mais intensos (figura 1.2e). Geralmente, a magnitude dos acoplamentos ${}^{1}J_{CC}$ é suficientemente diferente entre os pares de carbonos de uma mesma unidade precursora, permitindo distinguir unidades intactas do precursor. Eventualmente, é possível se observar um segundo acoplamento ${}^{13}C-{}^{13}C$ (${}^{2}J_{CC}$) oriundo da interação de duas unidades adjacentes de precursor (MACEDO JÚNIOR, 2007).

Estudos de incorporação com precursores isotopicamente marcados permitiram investigar as rotas de biossíntese de PNs, bem como as reações envolvidas nestas rotas. A origem biossintética dos metabólitos secundários originários de plantas, micro e macro-organismos, constitui um dos aspectos mais relevantes da pesquisa em química de PNs. O esclarecimento das rotas bioquímicas envolvidas em sua formação é imprescindível, pois conhecendo as enzimas envolvidas nessas reações e seus mecanismos, pode-se incrementar ou modificar uma rota biossintética, utilizando-se de técnicas de engenharia genética e molecular para sintetizá-los, mimetizando processos biológicos ou para produzir novos compostos, com melhores resultados em bioensaios.

1.2 Estudo de biossíntese de produtos naturais de micro-organismos no Brasil

Poucos estudos visando à elucidação da rota biossintética de PNs produzidos por fungos são relatados na literatura por pesquisadores brasileiros e apenas dois são de fungos do ambiente marinho.

Recente levantamento bibliográfico de PNs oriundos de micro-organismos exclusivamente isolados e purificados por pesquisadores brasileiros, mostra que apenas 14 % dos metabólitos secundários são de micro-organismos do ambiente marinho (3 % de sedimentos marinhos, 6 % de algas e 5 % de invertebrados marinhos). A mesma análise mostra que 50 % dos metabólitos isolados são oriundos da rota dos policetídos, 19 % dos terpenos, 13 % dos peptídeos, 13 % de biossíntese mista, e 2 % são alcalóides (IÓCA, ALLARD e BERLINCK, 2014).

O primeiro estudo de biossíntese de um metabólito microbiano realizado no Brasil foi do terreinol (**1**), isolado do extrato orgânico do meio de cultivo do fungo *Aspergillus terreus*. Experimentos utilizando [1-¹³C]acetato de sódio suprimiram a produção de **1**. A administração de [1-¹³C]-*D*-glicose ao meio de cultivo indicou que **1** é derivado da rota de acetato, e que provavelmente a metila em C13 é proveniente de metionina (MACEDO JÚNIOR, PORTO e MARSAIOLI, 2004).

Experimentos utilizando-se [2-¹³C]-fenilalanina mostraram que a classe das brasiliamidas, aqui representada pelo composto brasiliamida A (**2**), produzida pelo fungo endofítico de *Melia azedarach*, *Penicillium brasilianum*, é oriunda da via dos fenilpropanóides (FILL, SILVA e RODRIGUES-FO, 2010).

A [1-¹³C]-*D*-glicose também foi utilizada para investigar a rota biossintética da afidicolina (**3**), um diterpeno produzido pelo fungo endifítico *Nigrospora sphaerica*. Após análise de RMN de ¹³C, concluiu-se que o padrão de incorporação em **3** é devido à transformação de glicose em mevalonato (LOPES e PUPO, 2011).



A elucidação da rota biossintética de dois dihidropirróis *N*-acilados, a (8*E*)-1-(2,3-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-2-metildec-8-eno-1,3-diona (**4**) e a 1-(2,3-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-2-metildecano-1,3-diona (**5**), produzidos em meio de cultura pelo fungo *Penicillium citrinum*, foi realizada utilizando diferentes precursores isotopicamente marcados. Apesar da sequência de eventos não ter sido elucidada, a origem biossintética desses dois compostos é oriunda de cinco unidades intactas de acetato (C6 a C15), uma unidade de metionina (C16) e uma unidade de ornitina (C2 a C5) (ROMMINGER *et al.*, 2012).

Além dos dihidropirróis *N*-acilados, o mesmo fungo *P. citrinum* produz em meio de cultura as citrinalinas A (**6**) e B (**7**), assim como a 17-hidroxicitrinalina (**8**). O estudo de biossíntese desses compostos concluiu que também são oriundos de uma rota biossintética mista, a partir de dois resíduos de aminoácidos, ornitina (C-16 a C-19) e triptofano (via ácido antranílico, C-7 a C-12), e unidades isopreno derivadas da glicose, via mevalonato (C-5, C-24, C-25 e C-14, C-26, C-27). Este foi o primeiro

relato de incorporação do resíduo de aminoácido ornitina como um precursor na biossíntese de alcalóides prenilados de origem fúngica (MERCADO-MARIN *et al.*, 2014).



1.3 Biossíntese de Policetídeos

Os compostos pertencentes à classe dos policetídeos compõem uma das maiores classes de PNs. São altamente diversificados e podem apresentar diferentes atividades biológicas. O mecanismo de montagem dos policetídeos se assemelha ao de ácidos graxos, ambos utilizando acetato como unidade extensora. A formação dos policetídeos pode ser considerada uma ramificação entre metabolismo primário e secundário, devido a uma separação no princípio da evolução (HERTWECK, 2009).

Experimentos utilizando acetato isotopicamente marcado indicam o envolvimento de ácido graxo sintase (*Fatty Acid Sintase*, FAS) ou policetídeo sintase (*Polyketide Sintase*, PKS) na biossíntese de um PN. Em ambos os processos, a cadeia de carbonos é estendida mediante sucessivas condensações de Claisen descarboxilativas, empregando unidades de malonil-SCoA (unidades acetil-SCoA ativadas), resultando em um aumento de unidades C₂ intactas a cada ciclo. Assim, a incorporação de acetato simplesmente marcado nessas cadeias, representado por [1-¹³C]acetato na figura 1.3, fornece um padrão alternando posições marcadas e não marcadas (MACEDO JÚNIOR, 2007).



Figura 1.3 - Mecanismo de formação de ácidos graxos e policetídeos.

Diferentemente das FAS, que necessariamente produzem uma cadeia alifática linear e pouco funcionalizada (figura 1.4, rota B completa), as PKS utilizam um conjunto maior de unidades iniciadoras e extensoras, e assim formar cadeias estruturalmente diversas. Além disso, o ciclo de redução (KR – cetoredutase, DH – dehidratase e ER – enoil redutase) a cada extensão é opcional, surgindo padrões mais complexos de funcionalização, originando macrolídeos, polifenóis, polienos e poliéteres. Por fim, podem ocorrer modificações adicionais, como ciclização, clivagem de ligação C-C, reações de rearranjo, glicosilação, alquilação, hidroxilação, epoxidação e halogenação, em decorrência da existência de outros domínios enzimáticos nos agregados gênicos para cada PN.

Os demais domínios apresentados na figura 1.4, KS – β -cetoacil sintase, MAT/AT – malonil/acil transferase e ACP – proteína carreadora de acila, são responsáveis pelo crescimento da cadeia de carbonos.

As PKS são divididas em três grupos: PKS I (enzima multidomínios), PKS II (enzimas monofuncionais) e PKS III (enzimas multifuncionais sem domínio ACP). Elas ainda podem ser classificadas como iPKS (PKS iterativa), onde um conjunto de domínios enzimáticos catalisam mais de um ciclo de elongação, ou niPKS (PKS não iterativa), ou seja, cada conjunto de domínios catalisa apenas um ciclo, assim o conjunto de genes que biossintetiza um PN tem várias cópias dos mesmos domínios. No caso das PKS I, elas também são classificadas como nrPKS (PKS não redutora), prPKS (PKS parcialmente redutora) ou hrPKS (PKS altamente redutora), dependendo da presença dos domínios redutores das FAS (HERTWECK, 2009).



Figura 1.4 - Mecanismos envolvidos na formação de ácidos graxos e policetídeos, discriminando as reações de cada domínio enzimático.

Fonte: Adaptado de HERTWECK (2009).

O domínio ACP tem como função transportar as unidades extensoras e cadeias intermediárias durante a formação de um policetídeo. Já o domínio AT catalisa a transferência das unidades extensoras da cadeia policetídica ao domínio ACP, tendo como resíduos catalíticos uma serina, uma histidina e uma arginina. Sabe-se que o domínio AT é específico para cada unidade extensora, podendo atuar como transferase, caso a unidade ligada a serina catalítica é a correta para determinado domínio AT, ou atua como hidrolase se unidade extensora estiver incorreta.

O domínio KS, responsável pela formação das ligações C-C, é altamente conservado, sendo utilizado como sonda nucleotídica para a construção de árvores filogenéticas. O mecanismo de crescimento da cadeia policetídica não é completamente compreendido, mas o sítio catalítico do domínio KS envolve um resíduo de cisteína e dois de histidina (figura 1.5). Primeiramente o resíduo de cisteína é acilado, recebendo a unidade iniciadora da cadeia policetídica, nesse caso representado por uma unidade acetil-SACP. Em seguida, o domínico ACP leva a unidade extensora de malonil-SACP para o sítio ativo, sendo um dos resíduos de

histidina responsável pela sua interação com o sítio ativo. Enquanto isso, o outro resíduo de histidina ativa uma molécula de água, necessária para a descarboxilação da unidade extensora de malonil-SACP. O ataque nucleofílico da molécula de água ao malonil-SACP gera um íon bicarbonato e um enolato, que por sua vez ataca a cisteína acilada, estendendo a cadeia policetídica.



Figura 1.5 - Mecanismo de reação hipotético para o domínio KS de PKS.

Fonte: Adaptado de KEATING-CLAY (2012).

Os domínios responsáveis pela formação de cadeias policetídicas reduzidas e ácidos graxos são: KR, DH e ER. O domínio enzimático KR é responsável pela redução da carbonila e consequente formação da hidroxila, esta podendo ter orientação *R* ou *S*. O mecanismo geral (figura 1.6) envolve os resíduos dos aminoácidos lisina, tirosina e serina encontrados no sítio catalítico e uma molécula de NADPH (fostato de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzido). A carbonila da cadeia policetídica sofre um ataque nucleofílico pelo NADPH, assim, o oxigênio adquire um próton da tirosina catalítica, que é estabilizada pela lisina vizinha. O resíduo de serina tem como função ativar a carbonila da cadeia policetídica



Figura 1.6 - Mecanismo de reação hipotético para o domínio KR de PKS.

Fonte: Adaptado de KEATING-CLAY (2012).

A formação da dupla ligação entre carbonos α e β deve-se a ação do domínio DH. O resíduo de aspartato foi proposto como doador de próton para a β -hidroxila, enquanto a histidina catalítica retira um próton do C_{α}, formando a insaturação na cadeia policetídica (figura 1.7).

Figura 1.7 - Mecanismo de reação hipotético para o domínio DH de PKS.



Fonte: Adaptado de KEATING-CLAY (2012).

Por fim, a ação do domínio ER reduz a insaturação formada pelo domínio DH. Este domínio também utiliza uma molécula de NADPH. O NADPH ataca o C_{β} do

intermediário enolato (via tautomeria ceto-enol), que aceita um próton do resíduo de tirosina (figura 1.8). Existem domínios ER que não possuem esse resíduo de aminoácido, deste modo, acredita-se que o próton doado ao C_{β} é oriundo de uma lisina, estabilizada por um resíduo de aspartato, ambos presentes no sítio catalítico de ER (KEATINGE-CLAY, 2012).





Fonte: Adaptado de KEATING-CLAY (2012).

Capítulo 2 Objetivos

O objetivo deste projeto foi investigar a rota de formação de três metabólitos secundários: a ciclotiocurvularina A, produzida por *Penicillium* sp. DRF2 e a piranonigrina C, bem como a naftoquinonaimina, ambas produzidas por *Aspergillus* sp. DLM3-8. As etapas destes estudos foram:

- Realizar experimentos para otimizar as condições de cultivo para maximizar a produção dos compostos de interesse.
- ii) Realizar experimentos de toxicidade com precursores biossintéticos sem marcação isotópica com o objetivo de verificar a viabilidade de estudos de biossíntese.
- iii) Realizar experimentos de incorporação de precursores isotopicamente marcados adicionados ao meio de cultura, para cada um dos três metabólitos.
- iv) Isolamento e purificação dos metabólitos isotopicamente marcados através de técnicas de cromatografia e análise por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear, de maneira a confirmar a incorporação dos precursores.
- v) Propor rotas de formação para os compostos em estudo.

Capítulo 3 Procedimentos experimentais

3.1 Equipamentos e Reagentes

3.1.1 Espectrometria de Massas (EM)

Todas as frações obtidas durante este projeto foram analisadas por cromatografia líquida acoplada a detectores de ultravioleta e de espectrômetria de massas (CLAE – UV – EM – IES). Esse sistema é composto por um cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters[®], modelo Alliance 2695, acoplado a um detector espectrofotométrico UV-visível Waters[®], modelo 2424 e um espectrômetro de massas Waters[®], modelo ZQ 2000. Todos gerenciados por um sistema Empower 2.0.

Análises de espectrometria de massas de alta resolução foram feitas em um sistema híbrido quadrupolo/tempo-de-voo, modelo Microtof-QII (Bruker Daltonics). A amostra foi introduzida via infusão direta usando seringa em uma vazão de 3 µL/min.

3.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Dois sistemas de CLAE foram utilizados para as separações: CLAE preparativo composto por uma bomba para gradiente quaternário Waters[®] 2535 e um detector UV/Visível Waters[®] 2489 (Empower 3.0), e um CLAE analítico composto por uma bomba para gradiente quaternário Waters[®] 600 Controller e um detector Waters[®] 2487 *Dual \lambda absorbance* (Empower 2.0).

3.1.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos utilizando-se um aparelho Bruker DRX 400 (9,4 Tesla), operado a 400,35 MHz na frequência do hidrogênio (¹H) e a 100,10 MHz na frequência do carbono (¹³C).

As amostras foram preparadas em solventes deuterados da marca Cambridge Isotopes Laboratories Inc., usado tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna.

Todas as análises de RMN foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, DQ – UFSCar.

3.1.4 Solventes

Os solventes utilizados para procedimentos de extração e cromatografia em coluna pré-empacotada foram em grau analítico (Synth). Nas metodologias de CLAE foram utilizados solventes em grau cromatográfico (AppliChem Panreac) e água destilada e purificada em um sistema MIIIi-Q Millipore equipado com resina de troca iônica e filtro biológico. A água destilada utilizada para preparo de meio de cultura foi preparada por um sistema de osmose reversa TE-4007-10 Tecnal.

Lista de solventes: acetato de etila (AcOEt), acetonitrila (MeCN), água (H₂O), diclorometano (CH₂Cl₂) e metanol (MeOH).

3.1.5 Precursores biossintéticos

Os precursores biossintéticos utilizados ($[1-^{13}C]$ glicose, $[1-^{13}C]$ acetato, $[1,2-^{13}C_2]$ acetato e $[U-^{13}C_3^{15}N_1]$ -L-cisteína) em todos os experimentos de incorporação foram da marca Cambridge Isotopes Laboratories Inc..

3.2 Generalidades

3.2.1 Procedimento geral utilizado no projeto

Para o estudo de biossíntese dos compostos selecionados seguiu-se a sequência de experimentos apresentada na figura 3.1.



Figura 3.1 - Sequência de procedimentos para experimentos de biossíntese.

3.2.2 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nesse projeto foram malte 3% (M3) e *Potato Dextrose Broth* (PDB). A composição do meio M3 é: 30 g de extrato de malte (Acumedia[®]) e 3 g de peptona de soja (Acumedia[®]), enquanto a composição do meio PDB é: 24 g de *Potato Dextrose Broth* (DifcoTM), ambos preparados em 1 L de água do mar artificial (ASW) e pH _{inicial} 8,0.

A ASW é composta por: 1,36 g de $CaCl_2 \cdot H_2O$, 9,68 g de $MgCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,61 g de KCl, 30,0 g de NaCl, 140,0 mg de NaH₂PO₄, 3,47 g de Na₂SO₄, 170,0 mg de NaHCO₃, 100,0 mg de KBr, 40,0 mg de SrCl₂ · 6H₂O e 30,0 mg de HBO₃, em 1 L de água destilada. Todos os sais são da marca Synth. Para meios sólidos foram adicionados 20 g/L de ágar (Himedia[®]).

3.2.3 Suspensão de esporos

Ambas linhagens estudadas foram isoladas de invertebrados marinhos. *Penicillium* sp. DRF2 foi isolada a partir da esponja marinha *Dragmacidon*

reticulatum, enquanto Aspergillus sp. DLM3-8, da ascídia Didemnum ligulum.

Para recuperá-las, as linhagens foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio de cultura M3 e PDB. Após o crescimento em placas, as linhagens foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio de cultura. A produção de esporos pela linhagem *Penicillium* sp. DRF2 foi mais eficiente em meio PDB, por isso, para os tubos inclinados foi utilizado este meio. A linhagem *Aspergillus* sp. DLM3-8 esporulou da mesma maneira em ambos os meios, por isso manteve-se o meio M3.

Para o preparo da solução de esporos, todas as etapas foram realizadas em fluxo laminar. Após 10 dias de crescimento, adiciou-se 5 mL de solução 0,5% de Tween 80 (Synth) autoclavada a cada tubo de ensaio. Em seguida, o micélio teve sua superfície raspada com uma alça de 15 cm estéril para que os esporos ficassem em suspensão. Essa emulsão foi filtrada em um sistema composto por lã de vidro em um kitassato com pérolas de vidro. O recipiente foi agitado manualmente para quebra do esporângeo e liberação dos esporos. O filtrado foi transferido para um tubo Falcon estéril, e centrifugado à 4000 rpm à temperatura ambiente por 15 minutos. A solução foi descartada e o pellet, contendo os esporos, suspendido em água destilada. A etapa composta pela centrifugação, descarte da fração líquida e suspenção em água foi repetida três vezes, assegurando a eliminação completa do Tween 80. Os esporos foram então contabilizados utilizando uma câmara de Neubauer. Quando necessário, a solução de esporos por mililitro.

Capítulo 4 Estudo da rota de formação da ciclotiocurvularina A produzida em meio de cultura pela linhagem fúngica *Penicillium* sp. DRF2

4.1 Biossíntese de lactonas do ácido dihidroxifenilacético

As lactonas do ácido dihidroxifenilacético (*Dihydroxyphenylacetic Acid Lactones*, DALs) são metabólitos que possuem uma estrutura macrocíclica de 12 carbonos condensada a um anel aromático, derivado do ácido dihidroxifenilacético. Essa classe de compostos compreende quase trinta substâncias relatadas na literatura, isoladas dos mais diversos gêneros de fungos do filo *Ascomycota*, como *Curvularia*, *Alternaria*, *Aspergillus* e *Penicillium* spp. (SHEN *et al.*, 2015).

O primeiro metabólito classificado como DAL e que nomeia grande parte dos compostos inseridos nessa classe é a curvularina (**9**), obtida a partir do meio de cultura do fungo *Curvularia* sp.. Além de relatar o isolamento de **9**, um estudo de biossíntese foi feito utilizando acetato de sódio marcado com ¹⁴C na carbonila, e concluiu que, assim como os ácidos graxos, **9** também era constituída seguindo a condensação cabeça-cauda de oito unidades de acetato (BIRCH *et al.*, 1959).



Após trinta anos, foi isolada a α , β -desidrocurvularina (**10**) do meio de cultura do fungo *Alternaria cinerariae*. Após adição de acetato isotopicamente marcado com ¹³C ([1-¹³C], [2-¹³C] e [1,2-¹³C₂]) e re-isolamento de **10** com diferentes marcações, confirmou-se, pelas análises de RMN 2D INADEQUATE, a conectividade entre átomos de carbono vizinhos de unidade intactas de [1,2-¹³C₂]acetato e unidades adjacentes do mesmo precursor, utilizando-se uma mistura 1:1 de [1-¹³C]:[2-¹³C]acetato (figura 4.1). O estudo também incluiu a incorporação de acetato marcado isotopicamente com ¹⁸O e ²H. No primeiro caso, observou-se que os oxigênios da macrolactona (exceto O-9) e as hidroxilas são oriundos das unidades de acetato. O

uso de acetato marcado com deutério revelou que a reação em C-12 é estereoespecífica (ARAI *et al.*, 1989).



Figura 4.1 - Proposta biossintética para a α,β-desidrocurvularina.

Estudos posteriores testaram a incorporação de precursores avançados durante a biossíntese da α , β -desidrocurvularina (**10**), os di-, tri- e tetracetídeos **11**-**18**, correspondentes à cadeia de carbonos parcialmente reduzida de C-9 a C-16. Estes foram sintetizados como tioésteres da N-acetilcisteamina (SNAC), pois são substratos mais prováveis para as PKS. Além disso, para evitar a degradação dos precursores, inibidores da biossíntese de ácidos graxos foram adicionados ao meio de cultura.



A incorporação de **11**, **12**, **15-17** foi confirmada após análise de RMN de ¹³C da α , β -desidrocurvularina obtida, observando-se sinais satélites do acoplamento dos

carbonos isotopicamente marcados que foram incorporados. No caso de **17**, verificou-se que O-9 é oriundo da carbonila de acetato.

Acredita-se que os precursores **13**, **14** e **18** não foram incorporados em **10**, pois a maquinaria PKS que a biossintetiza permite apenas o uso de cadeias externas de tamanhos e estados de oxidação específicos (YOSHIZAWA *et al.*, 1990; LI, MARTIN e VEDERAS, 1992; LIU, LI e VEDERAS, 1998).

Experimentos utilizando α , β -desidrocurvularina (**10**) isotopicamente marcada adicionada ao meio de cultura concluiu que **10** é o produto final da PKS, que após ser secretada pela célula é reduzida à curvularina (**9**) por enzimas extracelulares. Já a formação da 11-hidroxi-curvularina (**19**) é oriunda da adição de água na instauração de **10** via adição de Michael (figura 4.2) (LIU, LI e VEDERAS, 1998).

Figura 4.2 - Transformação de α , β -desidrocurvularina em 11-hidroxi-curvularina.



Os genes responsáveis pela biossíntese da α , β -desidrocurvularina (**10**) foram caracterizados e reproduzidos em *Sacharomyces cerevisiae* via expressão heteróloga. Concluiu-se que **10** é biossintetizada por um par de iPKS: primeiramente uma hrPKS produz uma cadeia tetracetídica reduzida, correspondente aos C-9 a C-16, que depois é transferida à uma nrPKS, onde são condensadas mais quatro unidades de acetato não reduzidas, responsáveis pela formação do anel 1,3-benzenodiol após ciclização (figura 4.3).

A expressão somente de um dos agregados gênicos responsáveis pela produção de **10**, ou seja, a expressão exclusiva da hrPKS ou da nrPKS em *S. cerevisiae* não resultou na produção da α , β -desidrocurvularina (**10**). No entanto, o cultivo da cepa que expressa a nrPKS com concomitante adição do precursor avançado **15** ao meio de cultura, observou-se a produção de **10** (XU *et al.*, 2013).



Figura 4.3 - Formação de α , β -desidrocurvularina por iPKS.

Fonte: Adaptado de XU et al. (2013).

4.2 Produtos naturais de fungos contendo um resíduo mercaptolactato

Poucos exemplos são encontrados na literatura de compostos sulfurados produzidos por fungos. Recentemente dois novos compostos contendo um resíduo 3-mercaptolactato condensado a um macrociclo derivado da classe das curvularinas foram isolados pelo Dr. Marcos Venicius Castro, nomeados ciclotiocurcularina A (**20**) e B (**21**), do meio de cultura da linhagem fúngica *Penicillium* sp. DRF2, oriundo da esponja marinha *Dragmacidon reticulatum* (CASTRO, 2015).



O pandangolideo 3 (22) (JADULCO *et al.*, 2001), as sumanarinas A (23) e C (24) (MENG *et al.*, 2013) e o parafaeosfaerídeo A (25) (LI *et al.*, 2015), também apresentam o resíduo de 3-mercaptolactato ou derivado em sua estrutura. Considerando os metabólitos 24 e 25, os autores sugerem sua formação como a

adição de Michael do resíduo de 3-mercaptopiruvato na instauração dos compostos α , β -desidrocurvularina (**10**) e parafaeosfaerídeo C (**26**), respectivamente.



Assim, o presente estudo busca determinar a origem do anel tetrahidrotiofeno do composto ciclotiocurvularina A (**20**) e propor uma rota para a sua formação. Este resíduo nunca foi observado como parte da estrutura de um metabólito secundário produzido por fungo.

4.3 Metodologia

4.3.1 Condições ótimas de cultivo para a produção de ciclotiocurvularina A

O estudo do metabolismo secundário da linhagem fúngica *Penicillium* sp. DRF2 foi descrito por Castro (2015). A produção da ciclotiocurvularina A (**20**) foi otimizada utilizando-se experimentos e análises de quimiometria, obtendo-se como condição ótima de cultivo: 80% da concentração total de nutrientes do meio de cultura malte 3%, 10% da concentração total de sais (oriundos da água do mar artificial), temperatura de crescimento de 15 °C, em modo estático, e tempo de cultivo de 35 dias.

Após o tempo de crescimento, o meio de cultura foi filtrado à vácuo através de uma camada de celite, separando-o do micélio. Em seguida foi feito um "clean-up" do meio por extração em fase sólida (EFS) em coluna de sílica gel derivatizada com grupos C_{18} (Sep-Pak[®] Vac 35cc – 10 g), utilizando-se fase móvel composta por H₂O / MeOH 1:0 (F0), 3:1 (F1), 1:1 (F2), 1:3 (F3) e 0:1 (F4). O composto em estudo foi obtido na fração F2, coletada e evaporada sob vácuo (Thermo Scientific – Savant, modelo SC210A).

No presente trabalho, adotou-se o mesmo procedimento estabelecido por Castro (2015) para o crescimento e fracionamento cromatográfico inicial do meio de cultura produzido por *Penicillium* sp. DRF2. As frações oriundas do fracionamento do extrato do meio de cultura do fungo *Penicillium* sp. DRF2 foram analisadas por CLAE-UV-EM (ítem 3.1.2) em uma coluna de fase reversa C_{18} Waters[®] X-Terra (dimensões: 4,6 x 25 mm, 5 µm), utilizando-se um gradiente linear de eluição 30-90% MeOH em H₂O por 20 minutos, ambos com 0,01% de ácido fórmico.

4.3.2 Curva de produção de ciclotiocurvularina A

Após recuperação da linhagem fúngica *Penicillium* sp. DRF2 e preparo da solução de esporos, esta foi cultivada em frascos Shott de 400 mL contendo 100 mL do meio de cultura, com inóculos contendo 10⁵ esporos/mL. O tempo de crescimento variou de 2 a 34 dias, realizando-se extrações apenas nos dias pares. As extrações

foram realizadas como descrito no ítem 4.3.1. Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

O perfil metabólico da fração F2 obtida após EFS do meio de cultura foi analisado por CLAE-UV-EM. Nos cromatogramas obtidos, mediu-se a área sob o pico correspondente à ciclotiocurvularina A (**20**) no comprimento de onda de 254 nm.

4.3.3 Teste de toxicidade com precursores isotopicamente não-marcados

A linhagem fúngica *Penicillium* sp. DRF2 foi cultivada adicionando-se quantidades crescentes de acetato de sódio (AcONa) e L-cisteína (L-Cys), com o intuito de se observar uma eventual toxicidade destes precursores. Observou-se o crescimento e morfologia macroscópica do fungo, bem como o perfil metabólico da fração F2 obtida após EFS do meio de cultura (analisado por CLAE-UV-EM sob um gradiente exploratório como descrito em 4.3.1).

A linhagem foi cultivada em frascos Shott de 200 mL contendo 50 mL de meio de cultivo, com inóculos de 10⁵ esporos/mL. Foram adicionados 0,5 g/L, 1,0 g/L e 2,0 g/L em diferentes experimentos de crescimento no primeiro e no sexto dia de crescimento. Foram mantidas duas culturas sem adição de precursor como experimentos padrão. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Após o período de crescimento, os meios de cultura foram filtrados, submetidos à EFS e analisados por CLAE-UV-EM como descrito em 4.3.1.

4.3.4 Experimento de incorporação de precursores isotopicamente marcados

Foram realizados experimentos com adição de precursores isotopicamente marcados no meio de cultura do fungo *Pencillium* sp. DRF2. Cada experimento foi realizado em triplicata.

A linhagem foi cultivada em pequena escala como descrito em 4.3.3. A adição de $[1-^{13}C]AcONa$, $[1,2-^{13}C_2]AcONa$ e $[U-^{13}C_3^{15}N_1]$ -L-Cys foi feita no sexto dia de crescimento. Os meios de cultura foram extraídos no vigésimo dia de crescimento. Os inóculos foram enriquecidos com precursores isotopicamente marcados com ¹³C em uma concentração final de 1 g/L para acetato e 0,25 g/L para L-cisteína. O perfil
metabólico da fração F2 obtida após EFS do meio de cultura foi analisado por CLAE-UV-EM para confirmar a incorporação dos precursores na ciclotiocurvularina A.

Com um resultado positivo de incorporação, o fungo *Penicillium* sp. DRF2 foi cultivado nas mesmas condições em maior volume (totalizando 0,5 L para cada precursor) para procedimentos de isolamento e purificação do composto ciclotiocurvularina A (**20**) isotopicamente marcado.

4.3.5 Isolamento e purificação da ciclotiocurvularina A enriquecida

A fração F2 obtida após EFS do meio de cultura de cada experimento de incorporação foi separada por CLAE utilizando-se coluna preparativa de fase reversa C₈ Inertsil/C8-4 (dimensões: 14 x 250 mm, 5 μ m), utilizando-se como fase móvel MeCN / H₂O (34:66), fluxo 7 mL/min e monitorada nos comprimentos de onda 254 e 280 nm. Esta separação resultou em quatro frações (A-D).

A purificação da fração F2-A foi realizada por CLAE em coluna semipreparativa de fase reversa C₁₈ Inertsil/ODS2 (dimensões: 9,4 x 250 mm, 5 μ m), fase móvel MeCN / MeOH / H₂O (17:33:50), fluxo 2 mL/min e monitorada nos comprimentos de onda 254 e 280 nm.

4.3.6 Análise por ressonância magnética nuclear do composto ciclotiocurvularina A isotopicamente marcada

A ciclotiocurvularina A (**20**) foi submetida à análises por RMN de ¹³C para obtenção de dados que indicassem a incorporação dos precursores isotopicamente marcados oriundos dos diferentes experimentos de incorporação. Aproximadamente 3 mg de cada amostra foram diluídos em 150 μ L de MeOH-*d*₄, utilizando-se TMS como padrão de referência interna.

Os espectros de RMN de ¹³C foram utilizados para o cálculo das taxas de incorporação específica para cada carbono. Assim, determinou-se as áreas dos singletos para cada carbono da molécula padrão por integração de sinais, utilizando-se o software TopSpin 2.0. Estes valores foram utilizados como fonte de referência, totalizando 1,1 % (indicativo da abundância natural de ¹³C em qualquer molécula). A

seguir, determinou-se a soma das áreas do singleto central e multipletos adjacentes para as moléculas que sofreram incorporação com precursores marcados com ¹³C. Estes valores foram calculados em relação aos valores obtidos para a molécula padrão, resultando na taxa de incorporação específica em % (KUBANEK e ANDERSEN, 1999).

4.3.7 Experimento de incorporação de homocisteína

A linhagem *Penicillium* sp. DRF2 foi cultivada em 1 L de meio de cultura, como descrito em 4.3.3. Os inóculos foram enriquecidos com homocisteína em uma concentração final de 0,25 g/L no sexto dia de crescimento. O meio de cultura foi filtrado no vigésimo dia de crescimento, seguindo-se pré-purificação por EFS. Todas as frações foram coletadas: H_2O / MeOH 3:1 (F1), 1:1 (F2), 1:3 (F3) e 0:1 (F4). O perfil metabólico de cada fração foi analisado por CLAE-UV-EM.

4.3.8 Isolamento e purificação das frações oriundas do meio de crescimento enriquecido com homocisteína do fungo *Penicillium* sp. DRF2

Após análise por CLAE-UV-EM, as frações F2 e F3 foram reunidas e as demais descartadas. Para a sua separação por CLAE foi utilizada um coluna semipreparativa de fase reversa C₁₈ Inertsil/ODS2 (dimensões 9,4 x 250 mm, 5 μ m); fase móvel MeOH / H₂O 3:2, fluxo 2 mL/min e monitorada nos comprimentos de onda 254 e 280 nm. Esta separação resultou em três frações (A-C).

A fração B foi purificada por CLAE em coluna semi-preparativa de fase reversa C₈ InertSustain (dimensões 10 x 250 mm, 5 μ m); fase móvel MeOH / H₂O 3:7 por 2 min, MeOH / H₂O 2:3 por 2 min e MeOH / H₂O 45:55 por 36 min, fluxo 2,5 mL/min e monitorada nos comprimentos de onda 254 e 280 nm. Dessa separação foram obtidas sete frações, nomeadas B1-B7. Após análise por CLAE-UV-EM, constatou-se que as frações B2-B5 estavam puras e foram encaminhadas para análises por RMN de ¹H.

4.4 Resultados e Discussão

4.4.1 Obtenção da curva de produção da ciclotiocurvularina A por *Penicillium* sp. DRF2

A medida da área sob o pico correspondente a ciclotiocurvularina A (**20**, $t_r = 14,1$ min) é mostrada na tabela 4.1, onde R1 e R2 designam as duplicatas de cada experimento. A análise desses dados indica que a produção de **20** se inicia no sexto dia de crescimento e tem um ponto máximo no vigésimo dia. Os dados da tabela 4.1 foram utilizados para a construção da curva de produção apresentada na figura 4.4.

Considerando-se que os precursores biossintéticos (acetato e aminoácidos em geral) podem ser desviados para rotas do metabolismo primário, como respiração celular e produção de enzimas, o dia escolhido para a adição do precursor ao meio de cultivo foi o sexto dia de crescimento. Do mesmo modo, o vigésimo dia de crescimento foi selecionado para a extração dos metabólitos produzidos em meio de cultivo por EFS, evitando-se uma eventual degradação do composto **20**.

Tempo	Are	ea sob pico	
(dias)	R1 ▲	R2 ∎	Média
0	0	0	0,0
2	0	0	0,0
4	0	0	0,0
6	1	0	0,5
8	21	26	23,5
10	36	61	48,5
12	78	70	74,0
14	105	100	102,5
16	136	123	129,5
18	122	148	135,0
20	223	219	221,0
22	160	131	145,5
24	147	169	158,0
26	166	150	158,0
28	148	187	167,5
30	166	111	138,5
32	185	169	177,0
34	132	149	140.5

Tabela 4.1 - Medidas da área sob o pico correspondente a ciclotiocurvularina A produzida em cultivos com tempos diferentes de crescimento pela linhagem fúngica *Penicillium* sp. DRF2.

Figura 4.4 - Curva de produção da ciclotiocurvularina A produzido em meio de cultura pela linhagem fúngica *Penicillium* sp. DRF2.



4.4.2 Testes de toxicidade com precursores não marcados isotopicamente

O teste de toxicidade com acetato de sódio sem marcação isotópica (AcONa) não mostrou qualquer mudança no perfil metabólico da linhagem fúngica *Penicillium* sp. DRF2 ou em sua morfologia macroscópica após a adição de qualquer quantidade de AcONa ao meio de cultivo no primeiro ou no sexto dia de crescimento. Deste modo, foi utilizada a concentração de 1 g/L para testes iniciais de incorporação em pequena escala com os precursores [1-¹³C]acetato de sódio.

O teste de toxicidade com L-cisteína (L-Cys) sem marcação isotópica mostrou que o fungo esporula intensamente nas concentrações 0,5 g/L e 1 g/L, quando o aminoácido é adicionado no sexto dia de crescimento (figura 4.5). Além disso, a análise dos cromatogramas dos extratos mostra que nesta condição o perfil metabólico é alterado substancialmente, com a redução da produção do composto em t_r = 12,06 min (seta vermelha), outros desaparecendo completamente (t_r = 14,09, seta verde) e outros sendo produzidos como os de t_r = 9,17 e 14,39 (setas azuis) nas concentrações acima de 2 g/L de L-Cys (figura 4.6). Quando a adição ocorre concomitantemente ao inóculo, ou seja, no primeiro dia de crescimento, o crescimento do fungo ficou comprometido.

A toxidez de cisteína já foi relatada na literatura, sendo atribuída a reatividade do grupo sulfidrila e sua capacidade redutora. Em concentrações acima de 2 mM, observou-se mudanças morfológicas em fungos (KUNERT, 2000).

Figura 4.5 - Morfologia macroscópica da linhagem fúngica *Penicillium* sp. DRF2 na ausência de precursor (a) e na presença de 0,5 g/L de L-Cys (b).



Figura 4.6 - Sobreposição dos cromatogramas (λ_n = 254 nm) do extrato do meio de cultura da linhagem fúngica *Penicillium* sp. DRF2 com adição de L-Cys nas concentrações 0,0 g/L (preto), 0,5 g/L (azul) e 2,0 g/L (ciano).



A análise dos cromatogramas dos extratos dos testes de toxicidade de crescimento do fungo *Penicillium* sp. DRF2 na presença de L-Cys quanto a produção de ciclotiocurvularina A, mostrou que a partir da concentração de 1 g/L a produção deste composto (t_r 14,06 – *m*/z 411) é reduzida, enquanto na concentração de 0,5 g/L, outros compostos são produzidos. Portanto os experimentos com adição de [U- $^{13}C^{15}N_1$]-L-cisteína foram realizados na concentração de 0,25 g/L.

4.4.3 Experimentos de biossíntese para ciclotiocurvularina A

Após a EFS dos experimentos de crescimento enriquecidos com [1- 13 C]acetato de sódio, [1,2- 13 C₂]acetato de sódio e [U- 13 C₃ 15 N₁]-L-cisteína, e purificação das frações contendo a ciclotiocurvularina A (**20**), obteve-se 3,0 mg, 3,6 mg e 9,3 mg de **20** com cada precursor, respectivamente.

As análises por CLAE-UV-EM indicaram a incorporação desses precursores. Observou-se um aumento na intensidade dos sinais dos íons $[M+H]^+$ quando comparados com **20** sem marcação isotópica (figura 4.7a). Também foi possível observar um aumento expressivo na intensidade dos sinais $[M+2]^+$, $[M+3]^+$, $[M+4]^+$, $[M+5]^+$, $[M+6]^+$, $[M+7]^+$ e $[M+8]^+$, de acordo com o padrão de incorporação de uma, duas, três, quatro, cinco, seis e sete unidades de $[1-^{13}C]$ acetato de sódio (figura 4.7b). Do mesmo modo, observou-se um incremento no valor dos sinais $[M+3]^+$, $[M+5]^+$, $[M+7]^+$, $[M+9]^+$, $[M+11]^+$, $[M+13]^+$ e $[M+15]^+$, de acordo com o padrão de incorporação de uma, duas, três, quatro, cinco, seis e sete unidades de $[1.2^{-13}C_2]$ acetato de sódio (figura 4.7c). Já na amostra com incorporação de $[U-^{13}C_3^{15}N_1]$ -L-cisteína, além do incremento do sinal do íon $[M+H]^+$, observou-se também um aumento do sinal $[M+4]^+$, correspondente a incorporação de uma unidade intacta de $[U-^{13}C_3^{15}N_1]$ -L-cisteína (figura 4.7d).

O mesmo padrão de incorporação obtido no espectro de massas da ciclotiocurvularina A foi observado para a ciclotiocurvularina B (**21**) quando o meio de cultura foi enriquecido com precursores isotopicamente marcados com ¹³C. No entanto, análises de RMN de ¹³C não foram realizadas pela pouca quantidade de massa que se obteve de **21** após sua purificação: 0,3 mg ([1-¹³C]AcONa), 0,7 mg ([1,2-¹³C₂]AcONa) e 2,7 mg ([U-¹³C₂¹⁵N]-L-cisteína).

A tabela 4.2 apresenta a taxa de incorporação específica calculada para cada carbono da ciclotiocurvularina A (**20**), indicando quais carbonos sofreram marcação isotópica. Os espectros de RMN de ¹³C processados pelo programa TopSpin 2.0, com os sinais integrados para o cálculo das taxas de incorporação, encontram-se no anexo.

A figura 4.8 apresenta a sobreposição dos espectros de RMN de ¹³C da ciclotiocurvularina A (**20**) sem marcação isotópica (preto) e incorporada com [1-¹³C]AcONa (vermelho). Nesta figura fica evidente o aumento na intensidade dos sinais correspondentes aos carbonos C-1, C-3, C-5, C-7, C-9, C-13 e C-15. Na

tabela 4.2 (terceira coluna) está calculada a taxa de incorporação desse precursor para cada sinal no espectro de RMN de ¹³C. O sinal correspondente ao carbono C-11 está sobreposto ao sinal do solvente (MeOH- d_4). O padrão de incorporação observado corresponde à formação de uma cadeia policetídica derivada de acetato.

Figura 4.7 - Espectros de massas de alta resolução da ciclotiocurvularina A (A, padrão) isolada do experimento com adição dos precursores: B) $[1^{-13}C]AcONa$, C) $[1,2^{-13}C_2]AcONa$ e D) $[U^{-13}C_3^{-15}N]$ -L-Cys.



O espectro apresentado na figura 4.9 corresponde à análise de RMN de ¹³C da ciclotiocurvularina A obtida do experimento de incorporação de unidades de [1,2-¹³C₂]acetato de sódio. Observa-se um aumento na intensidade e no surgimento de multiplicidade dos sinais correspondentes aos carbonos C-1 a C-16. Observa-se também a presença de sinais múltiplos flanqueando carbonos marcados com ¹³C. Estes sinais são chamados de "satélites de acoplamento ¹³C-¹³C", fenômeno que resulta do acoplamento de dois carbonos adjacentes enriquecidos com ¹³C. O cálculo das constantes de acoplamento ¹J_{CC} mostra unidades intactas de acetato incorporadas em **20**. Além disso, pode-se observar alguns acoplamentos ²J_{CC} entre unidades adjacentes de acetato, exemplificadas na figura 4.9 pelos sinais

correspondentes aos carbonos C-5 e C-7, nos quais se observam um segundo dublete, referente ao acoplamento de C-4 com C-5 e de C-6 com C-7. Isso não ocorre para C-1 e C-16, tendo em vista que estes carbonos não apresentam carbonos de unidades de acetato adjacentes.

Esses resultados corroboram com a biossíntese já relatada para os compostos da classe das curvularinas, nos quais, o anel macrocíclico é formado por oito unidades de acetato, sendo a lactona oriunda de cinco unidades e o anel benzeno por três unidades intactas de acetato (ARAI *et al.*, 1989).

Posição	δ ¹³ C ^a	[1- ¹³ C ₁]AcONa	[1,2- ¹³ C ₂]AcONa	[U- ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₁]-L-Cys	¹ J _{cc}
1	172,5	24,21	11,40	1,80	56 Hz
2	38,5	0,94	12,38	2,03	50112
3	136,3	26,94	7,10	2,13	61 Hz
4	111,8	0,98	12,58	2,28	
5	162,8	27,58	11,44	1,85	66 Hz
6	103,6	0,98	13,01	2,37	- 00112
7	160,5	27,67	13,02	1,84	67 Hz
8	121,7	n.d.	10,23	2,19	07112
9	209,7	23,31	11,63	1,09	30 Hz
10	64,0	0,82	14,10	2,42	- 59112
11	50,0	n.d.*	n.d.*	n.d.*	
12	34,9	1,06	12,76	2,30	36 Hz
13	27,7	23,39	12,91	2,45	31 Ц7
14	31,5	1,05	12,12	2,11	_ 54112
15	76,3	22,65	11,79	2,18	30 円7
16	21,7	1,17	12,63	2,30	- 39112
17	40,9	1,1	1,1	99,9	38 Hz
18	88,0	n.d.	n.d.	99,9	38 e 60 Hz
19	176,6	n.d.	n.d.	99,9	60 Hz

Tabela 4.2 - Taxa de incorporação (em %) de precursores isotopicamente marcados com ¹³C na ciclotiocurvularina A.

^a100 MHz, 12 h; n.d.: não detectado; n.d.* sobreposto ao sinal do solvente

Figura 4.8 - Espectros de RMN de ¹³C (MeOH-*d*₄, 100 MHz, 12 h) da ciclotiocurvularina A sem marcação isotópica (preto) e isolada do experimento com adição do precursor [1-¹³C]AcONa (vermelho). Espectros processados e sobrepostos no programa MestReNova.



Figura 4.9 - Espectros de RMN de ¹³C (MeOH- d_4 , 100 MHz, 12 h) da ciclotiocurvularina A sem marcação isotópica (preto) e isolada do experimento com adição do precursor [1,2-¹³C₂]AcONa (vermelho). Espectros processados e sobrepostos no programa MestReNova.



O espectro de RMN de ¹³C apresentado na figura 4.10 da ciclotiocurvularina A (**20**) oriunda do experimento de incorporação com $[U-{}^{13}C_3{}^{15}N_1]$ -L-cisteína apresenta aumento na intensidade e no surgimento da multiplicidade dos sinais correspondentes aos carbonos C-17, C-18 e C-19, o que comprova que a L-cisteína é precursora do ácido 2-hidroxi-3-mercaptopropanóico (3-mercaptolactato) que forma o grupo tetrahidrotiofeno da estrutura da ciclotiocurvularina A.

Neste caso, não se observa o sinal correspondente à abundância natural de ¹³C, completamente sobreposto pelo dublete devido ao acoplamento ¹J_{CC} da incorporação intacta do aminoácido L-cisteína como 3-mercaptolactato, verificando-se uma taxa de incorporação de 99,9 %. A ampliação dos sinais referentes aos carbonos C-17 e C-18, ilustra o padrão de acoplamento de ¹³C incorporado. O sinal de C-18 é um duplo dubleto, já que C-18 está entre dois carbonos isotopicamente marcados, enquanto C-17 é um dubleto (figura 4.10). A taxa de incorporação de L-cisteína pelo fungo, originando primeiramente lactato que é posteriormente transformado em acetil-SCoA (NELSON e COX, 2011).

Figura 4.10 - Espectros de RMN de ¹³C (MeOH- d_4 , 100 MHz, 12 h) da ciclotiocurvularina A sem marcação isotópica (preto) e isolada do experimento com adição do precursor [U-¹³C₃¹⁵N₁]-L-Cys (azul). Espectros processados e sobrepostos no programa MestReNova.



A figura 4.11 mostra a sobreposição do cromatograma da fração F2 oriunda da EFS do meio de cultivo obtido após a incorporação de $[1-^{13}C]AcONa$ (azul), $[1,2-^{13}C_2]AcONa$ (vermelho) e $[U-^{13}C_2^{15}N_1]$ -L-cisteína (preto). Nele observa-se que o perfil cromatográfico é o mesmo para todos os extratos, exceto pela presença de um pico a mais (P1) no extrato enriquecido com L-cisteína.

Sabendo-se que a linhagem fúngica *Penicillium* sp. DRF2 é produtora de curvularinas, sugere-se que o metabólito correspondente ao pico P1 seja a α , β -desidrocurvularina (**10**) condensada ao aminoácido cisteína adicionado ao meio de cultura, formando **27** como um artefato do experimento de incorporação. Essa hipótese resulta da análise do espectro de massas de P1 apresentado na figura 4.12-P1, no qual *m/z* 412 corresponde ao sinal do íon [M+H]⁺, e *m/z* 416 refere-se ao sinal [M+5]⁺ que confirma a incorporação intacta de [U-¹³C₂¹⁵N₁]-L-cisteína.

Figura 4.11 - Sobreposição dos cromatogramas da fração F2 oriunda da EFS do meio de cultivo da linhagem fúngica *Penicillium* sp. DRF2 após enriquecimento com precursores.



Além disso, supõe-se que o composto correspondente a P2, de *m/z* 309, com um fragmento em *m/z* 291, seja a 11-hidroxicurvularina (**19**), enquanto P3 seria a sumalarina C (**24**) (MENG, *et al.*, 2013) e P4 seu isômero 11*R*, ou vice-versa. A figura 4.12 mostra os espectros de P3 incorporado com diferentes precursores [1- 13 C]AcONa (P3-A), [1,2- 13 C₂]AcONa (P3-B) e [U- 13 C₂ 15 N₁]-L-cisteína (P3-C),

indicando a incorporação de acetato e do aminoácido L-cisteína como precursor do resíduo 3-mercaptolactato de **24**.



Figura 4.12 - Espectro de massas de outros compostos produzidos por *Penicillium* sp. DRF2 nos experimentos com adição de precursores isotopicamente marcados.

Considerando-se esses resultados, duas vias de biossíntese para a ciclotiocurvularina A (**20**) podem ser propostas (figura 4.13): a incorporação de Lcisteína ocorrre após sua transformação em 3-mercaptopiruvato (**28**), espécie reativa a ser condensada a cadeia policetídica antes (rota a), ou depois (rota b) da construção do anel aromático e ciclização da macrolactona. Na rota (b) o 3mercaptopiruvato reage com α , β -desidrocurvularina (**10**) por uma adição de Michael na ligação dupla conjugada, como uma pós-funcionalização.

Alguns fatos suportam que a rota (b) é mais provável que a rota (a): a alta taxa de incorporação do aminoácido L-cisteína, sugere que a reação ocorra como um processo químico, pois uma taxa de incorporação de aproximadamente 100 % indica que o aminoácido L-cisteína foi pouco desviado para rotas de metabolismo primário, como produção de proteínas; sabe-se que α , β -desidrocurvularina (**10**) facilmente reage por adição de Michael nas posições 10 e 11 (LIU, LI e VEDERAS,

1998), neste caso formando como **27** artefato. Além disso, foi isolado um estereoisômero da ciclotiocurvularina A, a ciclotiocurvularina B (**21**), sugerindo que a formação de **20** não ocorra por um processo enzimático estereoespecífico. Por fim, é conhecida a atividade citotóxica de **10**, IC_{50} de 6,0 µM e 4,0 µM contra as linhagens de células tumorais HeLa (câncer cervical) e MCF-7 (câncer de mama) (MENG *et al.*, 2013), também produzida pelo fungo *Penicillium* sp. DRF2, enquanto que a ciclotiocurvularina A (**20**) não apresentou tal atividade contra as mesmas linhagens de células (CASTRO, 2015).

Desta forma, sugere-se que a formação das ciclotiocurvularinas resulte de um processo de detoxificação da α , β -desidrocurvularina pelo fungo. Pelo fato das ciclotiocurvularinas terem sido obtidas do extrato do meio de cultivo de uma condição de crescimento otimizada pelos procedimentos de planejamento experimental, atribui-se a produção destas pela ativação de um mecanismo de detoxificação devida a produção descomedida de **10**.



Figura 4.13 - Propostas de rotas biossintéticas para a ciclotiocurvularina A.

O processo de detoxificação pode ocorrer através da incorporação de glutationa (GSH, **29**) a compostos xenobióticos. Esse tripeptídeo, formado pelos resíduos de glutamato, cisteína e glicina, é fundamental para manter a homeostase redox da célula, tendo como funções limpar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e servir como estoque e transporte do aminoácido cisteína (HUBER, ALMEIDA e FÁTIMA, 2008).

O mecanismo de detoxificação por ação da GSH pode ser dividido em três fases: i) processos mediados pelas enzimas do citocromo P450 (não obrigatória); ii) conjugação de GSH ao composto tóxico, via ligação pelo grupo tiol da cisteína, para transformá-lo em uma espécie mais solúvel em água e de menor toxicidade; iii) transporte da espécie formada para o exterior da célula. Durante a fase iii, a espécie formada xenobiótico-GSH, perde os resíduos de glutamato e glicina, devido ao transporte pela membrana celular, sendo excretado da célula como xenobiótico-cisteína (HUBER, ALMEIDA e FÁTIMA, 2008).



A enzima responsável por catalisar o ataque nucleofílico de GSH ao xenobiótico (fase ii) é a glutationa transferase (GST). Essa enzima multifuncional, apresenta uma maior especificidade para um segundo substrato após sua ligação à GSH e tem como principais substratos haletos de alquila, epóxidos, compostos α , β -insaturados, haletos de arila e nitro aromáticos (HUBER, ALMEIDA e FÁTIMA, 2008).

A α , β -desidrocurvularina (**10**) e parafaeosfaerídeo C (**26**) são possíveis substratos para a GST, pois além de serem eletrófilos, ambos são compostos citotóxicos, podendo induzir um eventual dano ao organismo produtor. Ainda que esses compostos sejam biotransformados pela enzima GST, existe a necessidade de uma nova enzima que realize a transaminação do resíduo de L-cisteína ligado ao substrato para 3-mercaptopiruvato (**28**), seguida da redução da carbonila, formando 3-mercaptolactato, e assim produzindo os compostos sumalarina C (**24**), ciclotiocurvularina A (**20**) e parafaeosfaerídeo C (**26**). A figura 4.14 exemplifica esse mecanismo para o composto **20**. Esse processo foi sugerido para a biotransformação de um inibidor de DNA-primase por *Aspergillus niger* (ADELIN *et al.*, 2012) e para desintoxicação de plantas devido ao uso de herbicidas (CUMMINS *et al.*, 2011). Uma segunda hipótese seria que o resíduo de 3-mercaptopiruvato seja oriundo do catabolismo do aminoácido L-cisteína a piruvato (WRÓBEL *et al.*, 1997). Neste caso, a formação das ciclotiocurvularinas seria espontânea (mecanismo b, figura 4.13).





4.4.4 Experimento de cultivo enriquecido com homocisteína

A figura 4.15 apresenta os espectros de massas das frações B2 a B5 oriundas do fracionamento do extrato do meio de cultura enriquecido com homocisteína da linhagem fúngica *Penicillium* sp. DRF2.

Como dito anteriormente, sabe-se que esta linhagem é produtora de curvularinas, portanto sugere-se que o metabólito correspondente as frações B4 e B5 seja a α , β -desidrocurvularina condensada ao aminoácido não-proteinogênico homocisteína (**30**), formando **31**. Cada fração corresponde a um estereoisômero de **31**, uma vez que a adição de Michael em **30** na instauração da α , β -desidrocurvularina é possível e não estereoespecífica, como relatado para a formação da 11-hidroxi-curularina (LIU, LI e VEDERAS, 1998). Essa hipótese resulta da análise do espectro de massas (4.15-B4 e -B5), no qual *m/z* 426 corresponde ao sinal do íon [M+H]⁺, e *m/z* 291 refere-se ao fragmento correspondente à macrolactona. Do mesmo modo, as frações B2 e B3 correspondem aos estereoisômeros de **27**, hipotetizado anteriormente como a α , β -desidrocurvularina condensada ao resíduo do aminoácido cisteína.



Figura 4.15 - Espectro de massas dos compostos produzidos por *Penicillium* sp. DRF2 no experimento de cultivo com adição de homocisteína.



A produção das ciclotiocurvularinas A e B e da sumalarina C não foi observada nesse experimento. A adição de homocisteína ao meio de cultura foi realizada almejando a formação de um análogo à ciclotiocurvularina, que, ao invés do anel tetrahidrotiofeno condensado à macrolactona, teríamos um anel tetrahidrotiopirano (**32**). Este composto hipotético teria m/z 425, o qual não foi observado, bem como outro composto hipotético (**33**) análogo à sumalarina C, de m/z 427.

Deste modo, sugere-se que a formação de **31** ocorra por um processo químico (adição de Michael), assim como o intermediário **27** (α , β -desidrocurvularina condensada ao resíduo de cisteína), observado no experimento com adição de L-cisteína, mas que também pode ser formado via processo de detoxificação por GST.

Provavelmente, a presença de **31**, formado rapidamente através de um processo químico, impede que **27** seja biotransformado nas ciclotiocurvularinas e sumalarina C pela transaminase anteriormente proposta.



Capítulo 5 Estudo do metabolismo secundário da linhagem fúngica *Aspergillus* sp. DLM3-8 para a produção de metabólitos de interesse

5.1 O gênero Aspergillus spp.

O gênero de linhagens fúngicas *Aspergillus* foi descrito há quase 300 anos pelo botânico Antonio Micheli. Atualmente esse gênero representa um modelo para estudos comparativos de genoma, totalizando 14 espécies sequenciadas (GIBBONS e ROKAS, 2013).

São conhecidas centenas de espécies desse gênero, amplamente distribuídas na natureza, sendo capazes de crescer nos mais diversos ambientes, incluindo ambientes deficientes de nutrientes. Dentre todas as espécies, destaca-se *A. nidulans* como o organismo modelo, o xerófila *A. glaucus* e a fábrica celular *A. niger*, utilizada para a produção de proteínas heterólogas e ácidos orgânicos (ácido cítrico e gluconato). As enzimas extracelulares de *A. oryzae* e *A. sojae* são empregadas na panificação e fabricação de bebidas, como fermentadores da indústria alimentícia, responsáveis pela produção de saquê e molho de soja (LEE *et al.*, 2013; GIBBONS e ROKAS, 2013).

O metabolismo secundário das linhagens oriundas do ambiente terrestre e marinho de *Aspergillus* também é foco de muitos estudos. Diversas substâncias já foram isoladas, estruturalmente diversas e com potentes atividades biológicas (NIELSEN *et al.*, 2009). A análise do genoma de uma de suas linhagens indicou a presença de uma família de proteínas transcritas juntamente com o regulador global do metabolismo secundário *laeA*, indicando uma ligação entre a produção de metabólitos secundários, diferenciação morfológica e a formação de esporos. Mutantes de *A. nidulans* deficientes na produção de metabólitos secundários são menos tóxicos para insetos predadores do que a cepa selvagem. Alguns genes de *Aspergillus* spp. são transcritos apenas quando estas interagem fisicamente com outros micro-organismos, sugerindo que a produção de metabólitos secundários contribui como uma vantagem competitiva (GIBBONS e ROKAS, 2013).

Uma característica marcante da espécie de *A. niger* é a formação de esporos de coloração escura, variando entre verde oliva/marrom a preto. A aparência escura dos esporos deve-se à presença de pigmentos variados. Alguns desses pigmentos

são característicos de cada espécie, podendo ser utilizados na identificação de linhagens de *Aspergillus*.

Mutantes com relação à cor de esporos foram utilizados para caracterizar genes envolvidos na decodificação de proteínas requeridas para a pigmentação dos esporos e correlacioná-los ao metabolismo secundário. Após o cultivo de linhagens mutantes, a análise do perfil metabólico revelou uma conexão entre a formação de esporos pigmentados e a produção de metabólitos secundários, especialmente policetídeos, como as aurasperonas, e compostos nitrogenados, como as piranonigrinas (JORGENSEN *et al.*, 2011).

5.2 Compostos pirano-pirróis: a classe das piranonigrinas

As piranonigrinas apresentam grupos pirano e pirrol condensados. Inicialmente foram isoladas quatro substâncias pertencentes a essa classe, nomeadas piranonigrinas A-D (**34-37**), do extrato do meio de cultura de uma cepa de *Aspergillus niger*, oriunda de uma esponja marinha, *Axinella damicornis* (HIORT *et al.*, 2004). Em 2007, uma estrutura revista (**38**) foi proposta para a piranonigrina A, após o seu reisolamento do extrato de outra cepa de *A. niger* também oriunda de ambiente marinho e de um estudo minucioso dos espectros de RMN e dicroísmo circular do composto (SCHLINGMANN *et al.*, 2007).

A piranonigrina, denominada piranonigrina S (**39**) foi isolada juntamente com **36** do extrato metanólico de linhagens de *Aspergillus* utilizadas na indústria alimentícia, ambas com atividade antioxidante (MIYAKE *et al.*, 2007; MIYAKE *et al.*, 2008).

Recentemente, a rota biossintética das piranonigrinas A (**38**) e S (**39**) foi elucidada utilizando-se precursores isotopicamente marcados. Após análise dos espectros de RMN de ¹³C, concluiu-se que **39** é formada por quatro unidades de acetato (setas vermelhas) e uma do aminoácido glicina (azul), que, após hidroxilada, origina **38** (figura 5.1). Durante este estudo, foi isolada a piranonigrina E (**40**) (RIKO, NAKAMURA e SHINDO, 2013).



Figura 5.1 - Proposta de rota biossintética para as pirnanonigrinas S e A.



Fonte: Adaptado de RIKO, NAKAMURA e SHINDO (2013).

Um estudo simultâneo ao anterior, visando ativar genes silenciados em *A. niger*, homólogos aos preditos para a classe das piranonigrinas (*pynA*), fez uso de promotores para ativar o gene *pynA* e mais três genes em torno dele, denominados, *pynB*, *pynC* e *pynD*. Para essas três novas sequências, foi predita a transcrição de uma oxidoredutase FAD-dependente (Flavina-Adenina-Dinucleotéideo), uma N-metiltransferase e um oxidase P450, respectivamente. Após o crescimento de *A. niger* mutante, isolou-se um novo metabólito do extrato orgânico do meio de cultivo, também denominado piranonigrina E (**41**). Foi proposto que a formação dos anéis pirano-pirrol ocorre espontaneamente após a enzima liberar a cadeia PKS-NRPS (figura 5.2) (AWAKAWA *et al.*, 2013).



Figura 5.2 - Proposta de rota biossintética para a piranonigrina E.

Fonte: Adaptado de AWAKAWA *et al.* (2013); Domínios NRPS: C (condensação), A (adenilação), PCP (proteína carreadora de peptídeo), DKC (redutase).

Além dos compostos **35-41**, isolados de linhagens fúngicas do gênero *Aspergillus*, outros metabólitos secundários pertencentes a essa classe foram isolados de cepas de outros gêneros, como a cordilactama (**42**), obtido do extrato do meio de cultura do fungo *Cordyceps* sp., patógeno de aranha (ISAKA *et al.*, 2013), a

piranonigrina F (**43**), produzida por *Penicillium brocae*, linhagem isolada da planta de mangue *Avicennia marina* (MENG *et al.*, 2015).

Outros alcalóides semelhantes são as curvupalidas A-C (**44-46**), isolados do extrato do meio de cultivo do fungo fitopatogênico *Curvularia pallescens*, as faeosfaeridas A-B (**47-48**), produzidas pelo fungo *Phaeosphaeria avenaria* (ABRAHAM, MEYER e ABATE, 1995), e os parafaeosfaerídeos A-D (**25**, **49**, **26**, **50**), obtidos do meio de cultura do fungo endofítico *Paraphaeosphaeria neglecta* (MALONEY *et al.*, 2006), da planta Hawaiana *Lycopodiella cernua* (LI *et al.*, 2015).



Baseando-se nesses estudos, consideramos que a rota biossintética dos compostos piranonigrina B (**35**) e C (**36**) deveria ser substancialmente distinta da rota estabelecida para a piranonigrina A (**38**) e E (**41**), devido a posição do átomo de nitrogênio no anel pirrol. Nossas hipóteses de rotas biossintéticas para os compostos **35** e **36** são apresentadas na figura 5.3.

Figura 5.3 - Hipóteses de rotas de biossíntese para a piranonigrina B.



5.3 Alcalóides α-pironas

Poucos exemplos são encontrados na literatura de α -pironas nitrogenadas, como pirofeno (**51**) e isopirofeno (**52**), estereoisômeros isolados do extrato do meio de cultura do fungo endofítico *Aspergillus niger*, obtido da alga marrom *Colpomenia sinuosa* (ZHANG *et al.*, 2010), juntamente com o metabólito naftoquinonaimina (**53**) (ZHANG *et al.*, 2007). Além desses compostos, as campironas A-C (**54-56**), produzidas por uma cepa de *A. niger*, endofítica de *Zanthoxylum lemairei*, se destacam pela semelhança com as estruturas anteriores, diferenciando-se pela origem no átomo de nitrogênio. Supõe-se que para **53**, o aminoácido constituinte seja L-fenilalanina, enquanto que para as campironas **54-56**, seriam L-isoleucina, L-leucina e L-valina, respectivamente (TALONTSI *et al.*, 2013).

No primeiro isolamento de **53**, foi relatada uma atividade antifúngica moderada contra *Candida albicans*. Após o reisolamento desse composto do extrato da linhagem fúngica *Aspergillus* sp. DLM3-8, ensaios de citotoxidade apresentaram IC_{50} de 2,93 µg/mL, 6,67 µg/mL, 6,09 µg/mL e 1,40 µg/mL contra as linhagens celulares HCT-116 (câncer de cólon), OVCAR-8 (câncer de ovário), SF295 (glioblastoma) e HL-60 (leucemina) indicando que a naftoquinonaimina (**53**), além de citotóxica, é seletiva contra as linhagens de células cancerígenas.



A atividade citotóxica, assim como a estrutura de **53**, provavelmente sendo formada pela condensação do pirofeno (**51**) à uma naftoquinona, estimularam o estudo da sua origem biossíntetica. Nossa hipótese de biossíntese para a naftoquinonaimina é apresentada na figura 5.4.

Figura 5.4 - Hipótese para a rota de biossíntese da naftoquinonaimina.



5.4 Metodologia

5.4.1 Produção de piranonigrina C e naftoquinonaimina por *Aspergillus* sp. DLM3-8

O estudo do metabolismo secundário da linhagem fúngica *Aspergillus* sp. DLM3-8 foi realizado durante projeto de iniciação científica. Durante esse estudo, foram isolados os compostos piranonigrina C (**36**) e naftoquinonaimina (**53**).

Após recuperação da linhagem *Aspergillus* sp. DLM3-8 e preparo da solução de esporos, esta foi cultivada em modo estático, por 21 dias à temperatura ambiente, na ausência de luz e pouca ventilação, em 1 L de meio de cultura M3. Após esse período, foi adicionado AcOEt e deixado sob agitação por 3 dias. A mistura foi filtrada à vácuo através de funil de Buchner e uma camada de celite. O filtrado foi submetido a uma partição líquido-líquido. A fase orgânica foi separada e evaporada.

Após a obtenção do extrato orgânico, este foi separado por cromatografia em coluna pré-empacotada preparativa com fase estacionária de sílica gel (StractaTM – Phenomenex, 10 g / 60 mL). Utilizou-se como fase móvel um gradiente de eluição CH₂Cl₂ / AcOEt / MeOH 8:2:0 (F1), 6:4:0 (F2), 0:1:0 (F3) e 0:1:1 (F4).

À fração aquosa da partição líquido-líquido foi adicionada uma mistura 1:1:1 das resinas XAD-2, -4 e -7 na proporção de 15 g para cada 100 mL de meio de cultivo. A mistura meio + resinas foi deixada sob agitação durante uma noite. Após filtração, a mistura de resinas foi extraída com MeOH, MeOH / acetona 1:1 e acetona. Os solventes de extração da mistura de resina foram reunidos e evaporados, gerando a fração F5. Essa fração foi dissolvida em água para realizar uma extração em fase sólida, utilizando-se uma coluna cromatográfica de sílica gel derivatizada com grupos C₁₈ (Sep-Pak[®] Vac 35cc – 10 g), e fase móvel composta por H₂O / MeOH 7:3 (F5a), 3:7 (F5b) e 0:1 (F5c).

Alíquotas de 1 mg/mL das frações F1-F5 foram analisadas por CLAE-UV-EM. Amostras de piranonigrina C (**36**) e de naftoquinonaimina (**53**) foram utilizadas como padrão e analisadas por CLAE-UV-EM, sob as mesmas condições, com o objetivo de comparar tempo de retenção, espectro no UV e espectro de massas dos mesmos compostos.

As análises por CLAE-UV-EM foram realizadas em uma coluna de fase reversa C_{18} Waters[®] X-Terra (dimensões: 4,6 x 25 mm, 5 µm), utilizando-se

gradiente linear de eluição 10-100% MeOH em H_2O por 30 minutos, ambos com 0,01% de ácido fórmico.

5.4.2 Estudo da melhor metodologia de extração dos metabólitos produzidos em meio de cultura meio de cultivo

O fungo *Aspergillus* sp. DLM3-8 foi cultivado por 21 dias, na ausência de luz, em modo estático e temperatura ambiente, em frascos Shotts de 200 mL com 50 mL de meio de cultivo M3. Em seguida foram testados quatro procedimentos para a obtenção dos extratos:

- a) Extração do meio de cultura + micélio com AcOEt;
- b) Filtração do meio de cultura e subsequente extração do meio com AcOEt e do micélio também com AcOEt, separadamente.
- c) Filtração do meio de cultura e "clean-up" do meio por EFS em coluna cromatográfica de sílica gel derivatizada com grupos C₁₈, utilizando-se fase móvel composta por H₂O / MeOH 1:0, 3:1, 1:1, 1:3 e 0:1. O micélio foi extraído com MeOH em ultrassom (40 kHz);
- d) Extração do meio de cultura + micélio com CH₂Cl₂ / AcOEt 1:1; repetindose o procedimento três vezes.

Após a obtenção dos extratos, todos foram dissolvidos em MeCN e filtrados para remoção de ácidos graxos e analisados por CLAE-UV-EM como descrito em 5.4.1.

5.4.3 Planejamento fatorial fracionário (PFF)

A linhagem fúngica *Aspergillus* sp. DLM3-8 foi cultivada de acordo com um PFF de cinco variáveis, sendo estas: concentração de sais oriundos da água do ar artificial ([sais]), tempo de incubação (t), temperatura de incubação (T), agitação da cultura (rpm) e concentração total de nutrientes do meio de cultura M3 ([M3]). Foram realizados 16 experimentos de crescimento, em triplicata, conforme apresentado na tabela 5.1. Esta tabela foi construída considerando-se que cada variável pode ser utilizada em dois níveis: (+) como valor máximo da variável e (-) como valor mínimo

da variável. Na primeira coluna, correspondente a variável [sais], intercala-se um valor de mínimo e um de máximo, na segunda coluna (t), intercala-se dois valores de mínimo e dois de máximo, na terceira coluna (T), quatro mínimos e quatro máximos, e a quarta coluna (rpm), oito mínimos e oito máximos. O nível da variável [M3], quinta coluna, é dado pela multiplicação dos valores de mínimo ou máximo do mesmo experimento, ou seja, para o experimento #1, [M3] será utilizada em um nível máximo (+1), pois [sais] x t x T x rpm = (-1).(-1).(-1) = +1. A tabela 5.2 mostra os valores utilizados para os níveis de cada variável.

#	[sais]	Т	Т	rpm	[M3]
1	-1	-1	-1	-1	+1
2	+1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1	+1
5	-1	-1	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1	+1
8	+1	+1	+1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1
10	+1	-1	-1	+1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1
12	+1	+1	-1	+1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1
16	+1	+1	+1	+1	+1

Tabela 5.1 - Níveis das variáveis para os experimentos realizados para o PFF para o fungo *Aspergillus* sp. DLM3-8.

Tabela 5.2 - Valores utilizados para cada variável nos experimentos do PFF para o fungo *Aspergillus* sp. DLM3-8.

	Variáveis	[sais]	t (dias)	T (°C)	rpm	[M3]
Nívoic	-1	10 %	7	15	0	20 %
INIVEIS	+1	90 %	21	30	150	80 %

Após a obtenção dos extratos dos meios de cultura de cada experimento de crescimento de acordo com a melhor metodologia de extração determinada em 5.4.2, estes foram analisados por CLAE-UV-EM como descrito em 5.4.1.

A análise dos cromatogramas foi realizada através da medida das áreas dos picos correspondentes aos compostos em estudo, piranonigrina C (t_r = 14,8 min) e naftoquinonaimina (t_r = 26,9 min).

5.4.4 Testes para o cultivo da linhagem Aspergillus sp. DLM3-8

A linhagem fúngica *Aspergillus* sp. DLM3-8 foi cultivada na presença e ausência de luz, em diferentes experimentos, por 7, 14, 21 e 28 dias, à 28 °C, em modo estático, utilizando-se os meios de cultivo M3 e PDB, com o objetivo de se determinar uma nova condição para o estudo de biossíntese dos compostos piranonigrina C (**36**) e naftoquinonaimina (**51**).

Para isso, a linhagem DLM3-8 foi cultivada em frascos Shott de 400 mL contendo 100 mL de meio de cultura e inóculos contendo 10⁵ esporos/mL. Todos os experimentos foram extraídos com AcOEt na proporção 1:1 meio de cultivo / AcOEt, sob agitação esporádica durante 3 dias. Após esse período, a mistura foi filtrada à vácuo em funil de Buchner através de uma camada de celite. A mistura heterogênea foi submetida a uma partição líquido-líquido. A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica foi evaporada. Os extratos foram evaporados e secos sob vácuo. Após medida da massa de cada amostra, estas foram dissolvidas em 10 mL MeCN, filtradas em algodão e novamente evaporados e secos sob vácuo.

5.4.5 Curva de produção de metabólitos secundários

A linhagem fúngica *Aspergillus* sp. DLM3-8 foi cultivada em frascos Shott de 400 mL contendo 100 mL de meio de cultura M3, à 28 °C, em modo estático com inóculos contendo 10⁵ esporos/mL. O tempo de crescimento variou entre 5 e 29 dias, intercalando-se extrações apenas nos dias ímpares. As extrações foram feitas como descrito no ítem 5.4.4. Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

O perfil metabólico do extrato do meio de cultura foi analisado por CLAE-UV-EM. Os cromatogramas foram analisados medindo-se a área sob os picos correspondentes a piranonigrina C (**36**) e naftoquinonaimina (**53**) em λ_n = 254 nm.

5.4.6 Teste de toxicidade com precursores não-marcados isotopicamente

A linhagem fúngica *Aspergillus* sp. DLM3-8 foi cultivada adicionando-se quantidades crescentes (0,25 – 2,0 mg/mL) de precursores biossintéticos nãomarcados isotopicamente: acetato de sódio, propionato de sódio, prolina, metionina e fenilalanina. Esse experimento foi realizado com o intuito de se observar uma eventual toxicidade destes precursores para a linhagem fúngica produtora dos metabólitos de interesse, considerando-se a morfologia macroscópica do fungo e o perfil metabólico do extrato do meio de cultura analisado por CLAE-UV-EM (ítem 5.4.1). Os experimentos foram realizados em duplicata.

Para isso, esta linhagem foi cultivada em frascos Shott de 400 mL contendo 100 mL de meio de cultivo M3 líquido em ASW, em modo estático e à 28 °C. Os precursores foram adicionados no sexto dia de crescimento em experimentos separados. Após 14 dias foi feita extração foi descrito como no ítem 5.4.4.

5.4.7 Testes de incorporação de precursores isotopicamente marcados

Foram realizados 3 testes de incorporação de precursores isotopicamente marcados:

- A linhagem fúngica Aspergillus sp. DLM3-8 foi cultivada 1 L de meio de cultura M3. Foram adicionados [1-¹³C]AcONa e [1,2-¹³C₂]AcONa em três momentos (dias 6, 10 e 14), totalizando 1,0 g/L para cada precursor isotopicamente marcado, em experimentos isolados. Após 21 dias de crescimento, a cultura foi extraída com AcOEt como descrito no ítem 5.4.4. O extrato obtido foi analisado por CLAE-UV-EM para confirmar ou não a incorporação.
- 2. A linhagem fúngica Aspergillus sp. DLM3-8 foi cultivada em 1 L de meio de cultura M3. Foram adicionados [1-¹³C]glicose, [1-¹³C]AcONa e [1,2-¹³C₂]AcONa no dia sexto dia de cultivo em experimentos separados. Os experimentos de crescimento foram extraídos com AcOEt como descrito no ítem 5.4.4 no vigésimo primeiro dia. Os extratos obtidos foram analisados por CLAE-UV-EM para observar se houve ou não incorporação.

3. A linhagem fúngica Aspergillus sp. DLM3-8 foi cultivada em Erlenmeyers de 500 mL contendo 150 mL de meio de cultura M3 com ágar, em duplicata. Foram inoculados 10⁵ esporos/mL e adicionados 100 µg de [1-¹³C]glicose, [1-¹³C]AcONa e [1,2-¹³C₂]AcONa no primeiro dia, em experimentos separados. As culturas foram extraídas após 7 dias de crescimento com 100 mL de AcOEt em ultrassom por 30 min. A mistura foi filtrada à vácuo em funil de Buchner através de uma camada de celite, e submetida a uma partição líquido-líquido. A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica foi evaporada, e analisada por CLAE-UV-EM para confirmar a incorporação ou não dos precursores isotopicamente marcados.

5.5 Resultados e Discussão

5.5.1 Produção dos compostos piranonigrina C e naftoquinonaimina

A extração dos metabólitos produzidos em meio de cultura com AcOEt forneceu 809,5 mg de extrato bruto, enquanto a extração da mistura de resinas forneceu 512,3 mg de extrato. A separação cromatográfica em coluna de sílica do extrato de acetato de etila forneceu quatro frações: F1 (129,6 mg), F2 (98,9 mg), F3 (90,4 mg) e F4 (242,0 mg), enquanto a EFS da extrato obtido da mistura de resina, obteve-se três: F5a (282,0 mg), F5b (81,5 mg) e F5c (97,0 mg).

A análise por CLAE-UV-EM com extração dos íons $[M+H]^+$ de *m/z* 254 e 434, representando respectivamente, a piranonigrina C e a naftoquinonaimina, e comparação do tempo de retenção dos respectivos padrões (t_r = 14,6 min e t_r = 26,9 min), mostrou que a piranonigrina C estava presente na fração F2 e a naftoquinonaimina na fração F1. Portanto, confirmou-se a produção dos compostos **36** e **53** pela linhagem fúngica *Aspergillus* sp. DLM3-8.

5.5.2 Estudo da melhor metodologia de extração dos metabólitos produzidos em meio de cultivo

A análise por CLAE-UV-EM com extração dos íons e comparação do tempo de retenção dos respectivos padrões (conforme ítem anterior), mostrou que a piranonigrina C (**36**) e a naftoquinonaimina (**53**) puderam ser extraídas utilizando-se os métodos de extração a, b micélio, c micélio e d (tabela 5.3). Portanto, a produção de ambas está relacionada à presença dos esporos da linhagem *Aspergillus* sp. DLM3-8, como relatado por Jorgensen *et al.* (2011).

A medida da área sob o pico correspondente a cada composto, individualmente ou a soma de ambos, indicou que a extração dos metabólitos produzidos em meio de cultivo com CH₂Cl₂ / AcOEt 1:1 foi a mais eficiente. Uma nova metodologia foi utilizada para a realização do PFF, para unificar a etapa de extração e remoção dos ácidos graxos: primeiramente o meio de cultura e o micélio foram separados através de uma filtração à vácuo utilizando funil de Buchner com papel de filtro e uma camada de celite. O meio de cultura foi extraído com uma

mistura de CH₂Cl₂ / MeOH 9:1, deixando sob agitação por 1 h. O micélio foi extraído com uma mistura de CH₂Cl₂ / MeCN 1:1 em ultrassom por 30 min. Ambos os procedimentos de extração foram realizados três vezes.

	Extração	Área s	ob pico	Mass	a (mg)
	Extração	36	53	Extrato 1	Extrato 2
Α	AcOEt	42871	218400	25,3	15,8
D	AcOEt micélio	28184	1054451	9,4	7,2
D	AcOEt meio de cultura	-	-	5,8	3,8
C	MeOH micélio	45353	610405	34,7	15,0
C	EPS meio de cultura	-	-	27,0	13,1
D	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 1:1	69933	1711132	17,7	14,9

Tabela 5.3 - Análise das metodologias de extração dos metabólitos produzidos em meio de cultura da linhagem fúngica *Aspergillus* sp. DLM3-8.

5.5.3 Planejamento fatorial fracionário

A análise por CLAE-UV-EM com extração dos íons $[M+H]^+$ de *m/z* 254, correspondendo a piranonigrina C (**36**), mostrou que **36** estava presente em apenas três extratos, incluindo todas as triplicatas do PFF. Desse modo apenas a medida das áreas do pico correspondente ao composto naftoquinonaimina (**53**, t_r = 26,9 min) foi considerado para a análise do PFF (tabela 5.4).

Esses valores foram utilizados para o cálculo da função desejabilidade (D, equação 1), na qual D = desejabilidade, R = média das respostas obtidas, L = menor valor obtido para a resposta, T = maior valor obtido para a resposta. Essa metodologia multicritério transforma as respostas em um valor adimensional, que pode variar entre zero (resposta totalmente indesejável) à 1 (resposta totalmente desejável) (CASTRO, 2015). Os valores obtidos para D são expostos na tabela 5.5.

$$D = \frac{R - L}{T - L}$$
(equação 1)

Em seguida foi realizado o cálculo do efeito principal (efeito de 1^ª ordem), que indica qual é a variável que mais influencia na resposta dos experimentos. Para isso, numerou-se cada variável ([sais] =1, tempo de crescimento = 2, temperatura = 3, modo de crescimento = 4, [M3] = 5), em seguida, multiplicou-se o valor da

desejabilidade (D) de cada experimento pelo nível (-1 ou +1) de cada variável (tabela 5.1). A somatória desses valores é divido por 8, ou seja, a média entre os experimentos com nível máximo e mínimo. O resultado do cálculo é mostrado na tabela 5.5. O efeito de segunda ordem, que considera a interação entre duas variáveis, também foi calculado. Neste caso, multiplicam-se os níveis (-1 ou +1) correspondentes a duas variáveis pela desejabilidade de cada experimento. Novamente, a somatória é dividida por 8. O resultado desse cálculo também é apresentado na tabela 5.5.

#	R1	R2	R3	Média (\overline{R})
1	1586	580	2131	1432
2	1685	2854	25954	10164
3	15955	68625	250497	111692
4	28816	39495	218543	95618
5	200144	242531	173186	205287
6	248225	266549	415126	309967
7	131131	26906	542347	233461
8	175446	250240	363546	263077
9	1377	18108	619	6701
10	4989	2691	785	2822
11	1747	1643	997	1462
12	615	550	397	521
13	2982	1206	26738	10309
14	5212	6002	1050	4088
15	180	400	28293	9624
16	260	290	6601	2384

Tabela 5.4 - Medida da área sob a curva do pico correspondente à naftoquinonaimina (R1, R2 e R3 representam a triplicata.

Os resultados apresentados na tabela 5.5 indicam as condições de crescimento do experimento #6 como as melhores para a produção de naftoquinonaimina (**53**), dentre os 16 experimento realizados. O experimento #6 apresentou o maior valor para a função desejabilidade: 0,57. A fim de determinar a melhor condição de crescimento dentre todos os 32 experimentos possíveis em um PF, calculou-se os efeitos de 1ª e 2ª ordem. O maior valor em módulo para efeito de 1ª ordem é -0,28, resultante da variável 4, modo de crescimento. O sinal negativo indica que essa variável deve ser usada em seu nível mínimo, portanto um cultivo sem agitação.

		PF	ı.					Efeito	s de 1 ^a	ordem			Ш	feitos de	2 ^ª order	
#	-	7	ო	4	5	D	1×D	2xD	3xD	4xD	5xD		1x4xD	2x4xD	3x4xD	4x5xD
-	Ţ	ī	Ţ	Ţ	+	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00
7	+	ī	Ţ	Ţ	Ţ	0,02	0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02		-0,02	0,02	0,02	0,02
ო	7	+	Ţ	7	7	0,21	-0,21	0,21	-0,21	-0,21	-0,21		0,21	-0,21	0,21	0,21
4	+	Ŧ	Ţ	<u>,</u>	+	0,18	0,18	0,18	-0,18	-0,18	0,18		-0,18	-0,18	0,18	-0,18
2	Ţ	ī	+	Ţ	Ţ	0,38	-0,38	-0,38	0,38	-0,38	-0,38		0,38	0,38	-0,38	0,38
9	+	Ţ	+	<u>,</u>	+	0,57	0,57	-0,57	0,57	-0,57	0,57		-0,57	0,57	-0,57	-0,57
7	7	+	+	<u>,</u>	+	0,43	-0,43	0,43	0,43	-0,43	0,43		0,43	-0,43	-0,43	-0,43
œ	+	+	+	<u>,</u>	<u>,</u>	0,48	0,48	0,48	0,48	-0,48	-0,48		-0,48	-0,48	-0,48	0,48
6	Ţ	ī	ī	+	ī	0,01	-0,01	-0,01	-0,01	0,01	-0,01		-0,01	-0,01	-0,01	-0,01
10	+	ī	Ţ	+	+	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00
1	7	+	Ţ	+	+	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00
12	+	+	Ţ	+	7	00'00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00
13	7	Ţ	÷	+	+	0,02	-0,02	-0,02	0,02	0,02	0,02		-0,02	-0,02	0,02	0,02
14	+	Ţ	÷	+	7	0,01	0,01	-0,01	0,01	0,01	-0,01		0,01	-0,01	0,01	-0,01
15	7	Ŧ	÷	+	7	0,02	-0,02	0,02	0,02	0,02	-0,02		-0,02	0,02	0,02	-0,02
16	+	Ŧ	÷	+	+	00'0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00
							Σ 0,20	0,31	1,49	-2,2	0,09	М	-0,27	-0,35	-1,43	-0,10
						X	/8 0.03	0 04	0 19	-0.28	0 01	Σ/8	-0.03	-0 04	-0 18	-0.01

Tabela 5.5 - Cálculo da função desejabilidade e efeitos de 1ª e 2ª ordem no PFF para a naftoquinonaimina.

Com a definição da variável principal (4, modo de crescimento), calcularam-se os efeitos de 2ª ordem. Considerando-se o nível -1 como padrão, define-se o nível a ser utilizado para as demais variáveis. Todos os valores de efeitos de 2ª ordem foram negativos, portanto concentração de sais, tempo de crescimento, temperatura e concentração de nutrientes devem ser utilizados em seu nível máximo, +1.

As condições de crescimento obtidas pela análise da função desejabilidade e efeitos de 1ª e 2ª ordem são apresentados na tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Condições de crescimento estabelecidas para aprimorar a produção de naftoquinonaimina por *Aspergillus* sp. DLM3-8.

Exporimonto #			Variáveis		
Experimento # -	[sais]	t	Т	rpm	[M3]
6	+1	-1	+1	-1	+1
17	+1	+1	+1	-1	+1

Comparando os experimentos #6 e #17, nota-se que apenas o tempo de crescimento é alterado de 7 para 21 dias, respectivamente. O experimento #17 foi realizado, e após a medida da área sob o pico correspondente a naftoquinonaimina (**53**), confirmou-se que está é maior em #17 (\bar{R} = 341083) do que em #6 (\bar{R} = 309967).

Como a condição ótima de crescimento da linhagem fúngica *Aspergillus* sp. DLM3-8 para a produção da naftoquinonaimina tende à condição padrão, ou seja, utilizando a receita completa do meio de cultura M3 em ASW, 28 °C em modo estático, e considerando-se que a produção os compostos está relacionada à esporulação do fungo, outras condições foram testadas para o estudo de biossíntese.

5.5.4 Testes para o cultivo da linhagem Aspergillus sp. DLM3-8

Após análise por CLAE-UV-EM dos extratos obtidos dos cultivos na presença e ausência de luz por 7, 14, 21 e 28 dias, à 28 °C, utilizando-se os meios de cultivo M3 e PDB, não foi possível observar nenhuma alteração morfológica macroscópica ou qualquer mudança no perfil metabólico do extrato do meio de cultivo da linhagem fúngica *Aspergillus* sp. DLM3-8.

Além disso, observou-se que a produção da piranonigrina C foi maior com tempo de cultivo igual à 14 dias, sendo muito menor e/ou não detectada quando o fungo foi cultivado por 21 ou 28 dias.

O uso do meio de cultura PDB não se mostrou adequado, pois a produção de ambos os compostos, piranonigrina C (**36**) e naftoquinonaimina (**53**), foram menores das observadas no meio cultura M3.

5.5.5 Curva de produção de metabólitos secundários

Após análise por CLAE-UV-EM dos extratos obtidos dos cultivos diários e realizada a medida da área sob a curva do pico correspondente a cada composto, obteve-se os dados mostrados na tabela 5.7, assim como as figuras 5.5 e 5.6.

A figura 5.5 mostra que a produção de piranonigrina C varia consideravelmente de acordo com o tempo de crescimento do fungo, apresentando picos de produção nos dias 13, 21 e 23 de crescimento. Já a figura 5.6 mostra que a produção de naftoquinonaimina aumenta de acordo com o tempo de crescimento.

	Pi	ranonigrina	a C	Naft	oquinonai	mina
Dia	R1 ▲	R2 ∎	Média	R1 ▲	R2 ∎	Média
5	0,15	0,53	0,34	21	27	24
7	48	61	54,5	122	158	140
9	93	33	63	75	129	102
11	112	123	117,5	153	249	201
13	891	758	824,5	354	417	385,5
15	366	179	272,5	392	379	385,5
17	273	235	254	241	368	304,5
19	851	546	698,5	665	285	475
21	857	753	805	518	787	652,5
23	290	324	307	600	540	570
25	755	776	765,5	639	849	744
27	937	593	765	651	657	654
29	534	460	497	755	798	776,5

Tabela 5.7 - Medio	da da área	sob a curva	do pico	correspondente	à piranonigrina	Се
naftoquinonaimin	a.					

 λ_n = 254 nm, R1 e R2 representam a duplicata.
Figura 5.5 - Curva de produção da piranonigrina C produzida pela linhagem *Aspergillus* sp. DLM3-8.



Figura 5.6 - Curva de produção da naftoquinonaimina produzida pela linhagem *Aspergillus* sp. DLM3-8.



5.5.6 Teste de toxicidade com precursores não-marcados isotopicamente

Após análise por CLAE-UV-EM dos extratos obtidos dos cultivos com adição dos precursores sem marcação isotópica, não foi possível observar nenhuma alteração morfológica macroscópica do fungo.

A adição de acetato de sódio e propionato de sódio nas concentrações 0,5 g/L, 1,0 g/L e 2,0 g/L também não alterararam o perfil metabólico do extrato da

linhagem fúngica *Aspergillus* sp. DLM3-8, assim como a adição dos aminoácidos fenilalanina, prolina e metionina nas concentrações 0,25 g/L, 0,5 g/L e 1,0 g/L.

5.5.7 Testes de incorporação de precursores isotopicamente marcados

Considerando-se os dados obtidos nos itens 5.5.5 e 5.5.6, o primeiro teste de incorporação de precursores isotopicamente marcados foi realizado adicionando-se $[1-^{13}C]AcONa$ e $[1,2-^{13}C_2]AcONa$ de forma seriada, ou seja, foi adicionado o total de 1,0 g/L de precursor dividido em 3 dias de adição (6, 10 e 14), com extração no dia 21.

Após análise por CLAE-UV-EM, não foi observada qualquer incorporação dos precursores isotopicamente marcados nos compostos em estudo, ou em qualquer outro produzido pela linhagem fúngica *Aspergillus* sp. DLM3-8. Assim, o experimento foi repetido com a adição da concentração total de precursor (1 g/L) no dia 6º dia de crescimento.

Nesse segundo teste, além dos precursores [1-¹³C]AcONa e [1,2-¹³C₂]AcONa utilizados anteriormente, testou-se [1-¹³C]glicose, já que AcONa pode ser desviado para a produção de ácidos graxos e por isso sua incorporação poderia não ser observada nos metabólitos secundários produzidos em meio de cultura pela linhagem fúngica *Aspergillus* sp. DLM3-8. Novamente, após análise por CLAE-UV-EM, não foi observada qualquer incorporação dos precursores isotopicamente marcados nos metabólitos produzidos por *Aspergillus* sp. DLM3-8.

As análise dos PFF para o fungo *Aspergillus* sp. DLM3-8 mostrou que seus metabólitos secundários se concentram nos esporos, uma vez que os metabólitos em estudo, naftoquinonaimina e piranonigrina C, só foram observados por CLAE-UV-EM em extratos do meio de cultivo oriundo de experimentos em que foi observada a esporulação do fungo. Deste modo, buscou-se na literatura experimentos de incorporação de precursores isotopicamente marcados para metabólitos encontrados em esporos. Riko e colaboradores (2013) utilizaram meio de cultura sólido para o estudo da biossíntese do composto piranonigrina A. Após análise por CLAE-UV-EM dos extratos obtidos a partir da cultura de *Aspergillus* sp. DLM3-8 – teste 3, também não foi observado qualquer padrão de incorporação nos compostos em estudo.

Uma possível explicação para a incorporação dos precursores isotopicamente marcados não ter sido observada nos metabólitos secundários produzidos pela linhagem fúngica *Aspergillus* sp. DLM3-8, é o seu desvio para a rota de produção de ácidos graxos. Sendo assim, todo o AcONa adicionado teria sido utilizado pelo metabolismo primário do fungo.

Dois experimentos são sugeridos para se contornar esse problema: a) o uso de inibidores de ácido graxo sintase, com um estudo prévio para testar a sua viabilidade e b) mudança do meio de cultivo, trocando M3 por um meio de cultura mais simples, por exemplo, uma mistura de glicose e aminoácidos em água do mar artificial, meio mínimo específico para o gênero *Aspergillus* (JORGENSEN *et al*, 2011) e Czapek (FILL, SILVA e RODRIGUES-FO, 2010).

Os experimentos sugeridos em b estão em andamento. Espera-se que reduzindo a complexidade do meio de cultura, a incorporação de glicose isotopicamente marcada possa ser observada e elucidar a biossíntese da piranonigrina C e da naftoquinonaimina.

Capítulo 6 Conclusões

Os resultados obtidos do estudo de incorporação de precursores biossintéticos isotopicamente marcados para o composto ciclotiocurvularina A, produzido em meio de cultura pelo fungo *Penicillium* sp. DRF2, confirmaram que a macrolactona e o anel dihidroxibenzóico são provenientes da via de biossíntese dos policetídeos, bem como o aminoácido L-cisteína como precursor do resíduo 3-mercaptolactato no anel tetrahidrotiofeno. A análise desses resultados indicaram que este metabólito é provavelmente oriundo de um processo de detoxificação, devido à produção excessiva de um composto citotóxico, a α , β -desidrocurvularina, após otimização das condições de crescimento para a linhagem fúngica *Penicillium* sp. DRF2. Experimentos adicionais com adição do aminoácido não-proteinogênio homocisteína ao meio de cultura, sugere que a formação das ciclotiocurvularinas ocorra via um processo enzimático ou químico.

O estudo do metabolismo secundário da linhagem fúngica *Aspergillus* sp. DLM3-8, utilizando-se diversas estratégias para a produção de compostos formados por uma rota de biossíntese mista, piranonigrinas C e naftoquinonaimina, mostrou que o perfil metabólico permanece constante perante as mais diversas modificações nas condições de cultivo. Além disso, o insucesso da incorporação de precursores biossintéticos isotopicamente marcados nos metabólitos produzidos por essa linhagem sugere que novas abordagens devem ser desenvolvidas para se viabilizar estudos de biossíntese para essa linhagem, como o uso de inibidores de ácido graxo sintase ou um meio de cultura de constituição simples.

Este trabalho mostra a importância dos estudos envolvendo precursores isotopicamente marcados, uma abordagem clássica, que permite inferir particularidades sobre as rotas biossintéticas de produtos naturais de microorganismos.

Capítulo 7 Referências Bibliográficas

ABRAHAM, W.-R.; MEYER, H.; ABATE, D. Curvupallides, a new class of alkaloids from the fungus *Curvularia pallescens*. **Tetrahedron**, v. 51, n. 17, p. 4947-4952, 1995.

ADELIN, E.; MARTIN, M.-T.; BRICOT, M.-F.; CORTIAL, S.; RETAILLEAU, P.; OUAZZANI, J. Biotransformation of natural compounds: unexpected thio conjugation of Sch-642305 with 3-mercaptolactate catalyzed by *Aspergillus niger* ATCC 16404 cells. **Phytochemistry**, v. 84, p. 135-140, 2012.

ARAI, K.; RAWLINGS, B. J.; YOSHIZAWA, Y.; VEDERAS, J. C. Biosynthesis of antibiotic A26771B by *Penicillium turbatum* and dehydrocurvularin by *Alternaria cinerariae*: comparison of stereochemistry of polyketide and fatty acid enoyl thiol ester reductases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, p. 3391-3399, 1989.

AWAKAWA, T.; YANG, X.-L.; WAKIMOTO, T.; ABE, I. Pyranonigrin E: a PKS-NRPS hybrid metabolite from *Aspergillus niger* identified by genome mining. **ChemBioChem**, v. 14, p. 2095-2099, 2013.

BIRCH, A. J.; MUSGRAVE, O. C.; RICKARDS, R. W.; SMITH, H. Studies in relation to biosynthesis: part XX - the structure and biosynthesis of curvularin. **Journal of the Chemical Society**, p. 3146-3152, 1959.

CASTRO, M. V. Application of experimental design to improve the production of secondary metabolites produced by marine-derived *Penicillium* sp. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, p. 168. 2015.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, p. 829-837, 2004.

CUMMINS, I.; DIXON, D. P.; FREITAG-POHL, S.; SKIPSEY, M.; EDWARDS, R. Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. **Drug Metabolism Reviews**, v. 43, n. 2, p. 266-280, 2011.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products:** a biosynthetic approach. 3. ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2009. 539 p.

FILL, T. P.; SILVA, B. F.; RODRIGUES-FO, E. Biosynthesis of phenylpropanoid amides by an endophytic *Penicillium brasilianum* found in root bark of *Melia azedarach*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 622-629, 2010.

GIBBONS, J. G.; ROKAS, A. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 14-22, 2013.

HERTWECK, C. The biosynthetic logic of polyketide diversity. **Angewandte Chemie**, v. 48, p. 4688-4716, 2009.

HIORT, J.; MAKSIMENKA, K.; REICHERT, M.; PEROVIC-OTTSTADT, S.; LIN, W. H.; WRAY, V.; STEUBE, K.; SCHAUMANN, K.; WEBER, H.; PROKSCH, P.; EBEL, R.; MULLER, W. E. G.; BRINGMANN, G. New natural products from the spongederived fungus *Aspergillus niger*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1532-1543, 2004.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. Glutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

IÓCA, L. P.; ALLARD, P.-M.; BERLINCK, R. G. S. Thinking big about small beings the (yet) underdeveloped microbial natural products chemistry in Brazil. **Natural Products Reports**, v. 31, p. 646-675, 2014.

ISAKA, M.; CHINTHANOM, P.; RACHTAWEE, P.; SOMYONG, W.; LUANGSA-ARD, J. J.; HYWEL-JONES, N. L. Cordylactam, a new alkaloid from the spider pathogenic fungus *Cordyceps* sp. BCC 12671. **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 162-164, 2013.

JADULCO, R.; PROKSCH, P.; WRAY, V.; SUDARSONO; BERG, A.; GRAFE, U. New macrolides and furan carboxylic acid derivative from the sponge-derived fungus *Cladosporium herbarum*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 527-530, 2001.

JORGENSEN, T. R.; PARK, J.; ARENTSHORST, M.; WELZEN, A. M.; LAMERS, G.; VANKUYK, P. A.; DAMVELD, R. A.; HONDEL, C. A. M.; NIELSEN, K. F.; FRISVAD, J. C.; RAM, A. F. J. The molecular and genetic basis of conidial pigmentation in *Aspergillus niger*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p. 544-553, 2011.

KEATINGE-CLAY, A. T. The structure of type I polyketide synthases. **Natural Product Reports**, v. 29, p. 1050-1073, 2012.

KUBANEK, J.; ANDERSEN, R. J. Evidence for de Novo biosynthesis of the polyketide fragment of diaulusterol A by the Northeastern Pacific dorid nudibranch *Diaulula sandiegensis*. **Journal of Natural Products**, v.62, p. 777-779, 1999.

KUNERT, J. Physiology of keratinophilic fungi. **Revista Iberoamericana de Micologia**, p. 77-85, 2000.

LEE, Y. M.; KIM, M. J.; LI, H.; ZHANG, P.; BAO, B.; LEE, K. J.; JUNG, J. H. Marinederived *Aspergillus* species as a source of bioactive secondary metabolites. **Marine Biotechnology**, v. 15, p. 499-519, 2013.

LI, C.-S.; DING, Y,; YANG, B.-J.; MIKLOSSY, G.; YIN, H.-Q.; WALKER, L. A.; TURKSON, J.; CAO, S. A new metabolite with a unique 4-pyranone-γ-lactam-1,4-thiazine moiety from a Hawaiian-plant associated fungus. **Organic Letters**, v. 17, p. 3556-3559, 2015.

LI, Z.; MARTIN, F. M.; VEDERAS, J. C. Biosynthetic incorporation of labeled tetraketide intermediates into dehydrocurvularin, a phytotoxin from *Alternaria cinerariae*, with assistance of β -oxidation inhibitors. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, p. 1531-1533, 1992.

LIU, Y.; LI, Z.; VEDERAS, J. C. Biosynthetic incorporation of advanced precursors into dehydrocurvularin, a polyketide phytotoxin from *Alternaria cinerariae*. **Tetrahedron**, v. 54, p. 15937-15958, 1998.

LOPES, A. A.; PUPO, M. T. Biosynthesis of aphidicolin proceeds via the mevalonate pathway in the endophytic fungus *Nigrospora sphaerica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 1, p. 80-85, 2011.

MACEDO JÚNIOR, F. C. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹³C no estudo de rotas biossintéticas de produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 116-124, 2007.

MACEDO JÚNIOR, F. C.; PORTO, A. L. M.; MARSAIOLI, A. J. Terreinol - a novel metabolite from *Aspergillus terreus*: structure and ¹³C labeling. **Tetrahedron Letters**, v. 45, p. 53-55, 2004.

MALONEY, K. N.; HAO, W.; XU, J.; GIBBONS, J.; HUCUL, J.; ROLL, D.; BRADY, S. F.; SCHROEDER, F. C.; CLARDY, J. Phaeosphaeride A, an inhibitor of STAT3dependend signaling isolated from an endophytic fungus. **Organic Letters**, v. 8, n. 18, p. 4067-4070, 2006.

MENG, L.-H.; LI, X.-M.; LIU, Y.; WANG, B.-G. Polyoxygenated dihydropyrano[2,3*c*]pyrrole-4,5-dione derivatives from the marine mangrove-derived endophytic fungus *Penicillium brocae* MA-231 and their antimicrobial activity. **Chinese Chemical Letters**, v. 26, p. 610-612, 2015.

MENG, L.-H.; LI, X.-M.; LV, C.-T.; LI, C.-S.; XU, G.-M.; HUANG, C.-G.; Wang, B.-G. Sulfur-containing cytotoxic curvularin macrolides from *Penicillium sumatrense* MA-92, a fungus obtained from the rhizosphere of the mangrove *Lumnitzera racemosa*. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 2145-2149, 2013.

MERCADO-MARIN, E. V.; GARCIA-REYNAGA, P.; ROMMINGER, S.; PIMENTA, E. F.; ROMNEY, D. K.; LODEWYK, M. W.; WILLIAMS, D. E.; ANDERSEN, R. J.; MILLER, S. J.; TANTILLO, D. J.; BERLINCK, R. G. S.; SARPONG, R. Total synthesis and isolation of citrinalin and cyclopiamine congeners. **Nature**, v. 509, p. 318-324, 2014.

MIYAKE, Y.; MOCHIZUKI, M.; ITO, C.; ITOIGAWA, M.; OSAWA, T. Isolation of the antioxidant pyranonigrin A from rice mold starters used in the manufacturing process of fermented foods. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, n. 10, p. 2515-2521, 2007.

MIYAKE, Y.; ITO, C.; ITOIGAWA, M.; OSAWA, T. Antioxidative pyranonigrins in rice mold starters ans their suppressive effect on the expression of blood adhesion molecules. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 72, n. 6, p. 1580-1585, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 673-706.

NIELSEN, K. F.; MOGENSEN, J. M.; JOHANSEN, M.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, p. 1225-1242, 2009.

RIKO, R.; NAKAMURA, H.; SHINDO, K. Studies on pyranonigrins - isolation of pyranonigrin E and biosynthetic studies on pyranonigrin A. **The Journal of Antibiotics**, p. 1-3, 2013.

ROMMINGER, S.; PIMENTA, E. F.; NASCIMENTO, E. S.; FERREIRA, A. G.; BERLINCK, R. G. S. Biosynthesis of two dihydropyrrole-polyketides from a marinederived *Penicillium citrinum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 10, p. 1783-1788, 2012.

SCHLINGMANN, G.; TANIGUCHI, T.; HE, H.; BIGELIS, R.; YANG, H. Y.; KOEHN, F. E.; CARTER, G. T.; BEROVA, N. Reassessing the structure of pyranonigrin. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1180-1187, 2007.

SCHNEIDER, B. Nuclear magnetic resonance spectroscopy in biosynthetic studies. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 51, p. 155-198, 2007.

SHEN, W.; MAO, H.; HUANG, Q.; DONG, J. Benzenediol lactones: a class of fungal metabolites with diverse structural features and biological activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 747-777, 2015.

TALONTSI, F. M.; TATONG, M. D. K.; DITTRICH, B.; DOUANLA-MELI, C.; LAATSCH, H. Structures and absolute configuration of three α -pyrones from a endophytic fungus *Aspergillus niger*. **Tetrahedron**, v. 69, p. 7147-7151, 2013.

WRÓBEL, M.; UBUKA, T.; YAO, W.-B.; ABE, T. L-cysteine metabolism in Guinea pig and rat tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 116B, n. 2, p. 223-226, 1997.

XU, Y.; ESPINOSA-ARTILES, P.; SCHUBERT, V.; XU, Y.-M.; ZHANG, W.; LIN, M.; GUNATILAKA, A. A. L.; SUSSMUTH, R.; MOLNÁR, I. Characterization of the biosynthetic genes for 10,11-dehidrocurvularin, a heat shock response-modulating anticancer fungal polyketide from *Aspergillus terreus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 6, p. 2038-2047, 2013.

YOSHIZAWA, Y.; LI, Z.; REESE, P. B.; VEDERAS, J. C. Intact incorporation of acetate-derived di- and tetraketides during biosynthesis of dehydrocurvularin, a

macrolide phytotoxin from *Alternaria cinerariae*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, p. 3212-3213, 1990.

ZHANG, Y.; LI, X. M.; WANG, C. Y.; WANG, B. G. A new naphthoquinoneimine derivative from the marine algal-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13. **Chinese Chemical Letters**, v. 18, p. 951-953, 2007.

ZHANG, Y.; LI, X.-M.; FENG, Y.; WANG, B.-G. Phenethyl-α-pyrone derivatives and cyclodipeptides from a marine algous endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13. **Natural Product Research**, v. 24, n. 11, p. 1036-1043, 2010.

ANEXOS

Lista de figuras	
Figura S1 - Espectro de RMN de ¹³ C da ciclotiocurvularina A com abundância na de ¹³ C.	atural 83
Figura S2 - Espectro de RMN de ¹³ C da ciclotiocurvularina A isotopicamente marcada com [1- ¹³ C]acetato de sódio.	84
Figura S3 - Espectro de RMN de ¹³ C da ciclotiocurvularina A isotopicamente marcada com [1,2- ¹³ C ₂]acetato de sódio	85
Figura S4 - Espectro de RMN de ¹³ C da ciclotiocurvularina A isotopicamente marcada com [U- ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₁]-L-cisteína	86

Tabela S1 – Medida da área sob os sinais no espectro de RMN de ¹³C da ciclotiocurvularina A incorporada com diferentes precursores isotopicamente marcados com ¹³C.

Posição	δ ¹³ C ^a	Padrão	[1- ¹³ C ₁]AcONa	[1,2- ¹³ C ₂]AcONa	[U- ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₁]-L-Cys
1	172.5	0,597	13,1408	6,1893	2,1769
2	38.5	1,2093	1,0438	13,6205	4,9821
3	136.3	0,5118	12,5379	3,3067	2,2113
4	111.8	1,2241	1,0912	14,0021	5,6583
5	162.8	0,4687	11,7540	4,8748	1,7568
6	103.6	1,1544	1,0343	13,6620	5,5302
7	160.5	0,4472	11,2505	5,2935	1,6630
8	121.7	0,4408	n.d.	4,1028	1,9523
9	209.7	0,4517	9,5736	4,7790	1.0000*
10	64.0	0,8198	0,6180	10,5128	4,0094
11	50.0	n.d.*	n.d.*	n.d.*	n.d.*
12	34.9	1,2333	1,1977	14,3174	5,7310
13	27.7	1,1788	25,0712	13,8422	5,8566
14	31.5	1,2972	1,2457	14,2954	5,5440
15	76.3	1,3586	27,9855	14,5629	5,9988
16	21.7	1,1916	1,2759	13,6843	5,5450
17	40.9	1,0000*	1,0000*	1,0000*	222,1003
18	88.0	0,4458	n.d.	n.d.	100,8189
19	176.6	n.d.	n.d.	n.d.	84,7683

^a100 MHz, 12 h; n.d.: não detectado; n.d.* sobreposto ao sinal do solvente; *utilizado como padrão de referência para abundância natural de ¹³C.







 13 C da ciclotiocurvularina A isotopicamente marcada com [1,2- 13 C₂]acetato de sódio. Figura S9 - Espectro de RMN de

	₽699°22	5					-	-	2991.3-	[mdd]
₁]-L-cisteína.	31,4252 31,2024 31,2024 34,2151 34,2151 34,2025 36,2025 38,2020 38,2020 38,2020 38,2020							III	0190 1- 2501 1- 9250 2- 0552 0- 5975 111-	
- ¹³ C ₃ ¹⁵ N	40 9918 40 9935 41 0458 41 0939 43 1294							1	5 2103	50
com [U	2895.49 2825.49 264.7195	}							19183-	
arcada	76, 2044 76, 4023 76, 5905	}							09223-	
mente má	4996 98 2962 29 9295 28 62456 28	}						\neg	<u>53,8543</u>	-
otopicaı	103,4461 103,1302 103,4461	}							20077=	100
la A is	2162.111 9819.111 2037	}							5101' <u>1</u> -	
rvularin	8212,151	70						-	8695.0=	
ciclotiocu	139, 7008 139, 0196 139, 3128	}						-	0 4504	
IN de ¹³ C da	22118'651 1901 (930 1901 (933) 605'5888	ļ						1	-0-3356 -0-3356	150
- Espectro de RN	162,6457 172,2899 172,8289 173,8228 173,8228 173,8228 174,4422 174,44422 174,44442 174,44442 174,4444441745 174,44444 174,4444444444444444444444444						_		2874 Q- 997 78-	
Figura S10	8009,600	-							0000.2-	200
	[iai]	15	04	8	9	*	2	0	- 5	

. 11 13 15 15 1 1 -4 ÷ -. 130 Ľ

	Parâmetro	Figura S1	Figura S2	Figura S3	Figura S4
-	Solvente	MeOD	MeOD	MeOD	MeOD
7	Temperatura	300,0	300,0	300,0	300,0
ი	Sequência de pulso	zgpg30	zgpg30	zgpg30	zgpg30
4	Número de Scans	51200	51200	51200	51200
2	Tempo de relaxamento	0,1010	0,1010	0,1010	0,1010
9	Comprimento do pulso	15,0000	15,0000	15,0000	15,0000
2	Tempo de aquisição	0,6816	0,6816	0,6816	0,6816
6	Frequência	100,61	100,61	100,61	100,61

Tabela S2 – Parâmetros de aquisição dos espectros de RMN de ¹³C da ciclotiocurvularina A incorporada com diferentes precursores isotopicamente marcados com ¹³C.